



FR 00/2578

BREVET D'INVENTION

REC'D 24 OCT 2000

WIPO

PCT

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

4

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 03 OCT. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE
PRIORITÉ****PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1.a) OU b)**

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30





BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

15.09.99
9911543

15 SEP. 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY
20, rue de Maubeuge
75009 PARIS

n° du pouvoir permanent références du correspondant : IFB 99 AX CNR DORA
téléphone : 01.42.81.09.81

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale

☒ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES ISSUES DE GENES CODANT POUR LA TRIMETHYLAMINE N-OXYDE REDUCTASE
ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT POUR LA DETECTION DE BACTERIES.

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

C.N.R.S.
(Centre National de la Recherche Scientifique)

Forme juridique

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

3, rue Michel-Ange
75009 PARIS CEDEX 16

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs ☐ oui ☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES ☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

nature de la demande

pays d'origine

numéro

date de dépôt

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Charles Demachy
422.5/PP170

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 11543

TITRE DE L'INVENTION :

SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES ISSUES DE GENES CODANT POUR LA TRIMETHYLAMINE N-OXYDE REDUCTASE ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT POUR LA DETECTION DE BACTERIES.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

C. N. R. S.

(Centre National de la Recherche Scientifique).

3, rue Michel-Ange

F - 75794 PARIS CEDEX 16-

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

GIORDANO, Gérard

Château St-Cyr

Bâtiment les Peupliers

13010 MARSEILLE

DOS SANTOS, Jean-Philippe

16, avenue Jean Combard

13011 MARSEILLE

MEJEAN, Vincent

141 avenue de Hambourg

13008 MARSEILLE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 21 octobre 1999

Par procuration, le mandataire

Charles Demachy
422.5/PP170

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
P. 47, 48, 49, 50, 17, 18			α	1 ^{re} /10/99	28 FEV. 2000 - V D
				05/05/00	16 MAI 2000 - V D

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES ISSUES DE GENES CODANT POUR LA TRIMETHYLAMINE N-OXYDE REDUCTASE, ET LEURS UTILISATIONS, NOTAMMENT POUR LA DETECTION DE BACTERIES.

5

La présente invention a pour objet des séquences nucléotidiques issues de gènes codant pour la triméthylamine N-oxyde réductase (TMAO réductase) et utilisables, notamment en tant qu'amorces, pour la mise en œuvre de procédés de détection de bactéries impliquées dans l'altération des chairs d'animaux aquatiques, et plus particulièrement d'animaux marins.

10 Le triméthylamine N-oxyde (TMAO) est un des principaux constituants de petit poids moléculaire des animaux marins, où il peut représenter jusqu'à 1% de leur poids sec. En anaérobiose, certaines bactéries utilisent le TMAO comme accepteur exogène d'électrons pour leur respiration. Le TMAO est alors réduit en triméthylamine (TMA), composé très volatil, responsable en grande partie de l'odeur nauséabonde des poissons en voie de décomposition. La
15 réduction du TMAO en TMA a été mise en évidence chez les bactéries marines, comme celles du genre *Shewanella*, *Photobacterium* ou *Vibrio* (1, 2), chez des bactéries photosynthétiques isolées dans les eaux saumâtres, comme celles du genre *Rhodobacter* (3), mais aussi chez plusieurs entérobactéries, comme *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ou *Proteus vulgaris* (4).

20 L'enzyme responsable de la réduction du TMAO en TMA, correspond à la triméthylamine N-oxyde réductase (TMAO réductase), dont les propriétés ont été étudiées chez différents organismes. A titre d'exemple, il existe chez *E. coli* deux enzymes distinctes responsables de la réduction du TMAO : la TMAO réductase et la DMSO réductase. La TMAO réductase, qui est responsable de 90% de la réduction du TMAO, est une molybdoenzyme
25 périplasmique de 90 kDa, pouvant être trouvée sous forme de monomère ou de dimère (5). Les TMAO réductases des différentes bactéries étudiées sont toutes des molybdoenzymes de 80-100 kDa qui peuvent être retrouvées sous forme de monomère, dimère ou tétramère. Ces protéines sont toutes inductibles en anaérobiose par le TMAO, mais aussi par le DMSO (diméthylsulfoxyde). Enfin, hormis chez *P. vulgaris*, les TMAO réductases sont toutes
30 localisées dans le périplasme de la bactérie.

L'étude du système TMAO réductase au niveau génétique et moléculaire a été réalisée chez les entérobactéries *E. coli* et celles du genre *Rhodobacter*. Les deux TMAO/DMSO réductases des bactéries du genre *Rhodobacter* et la TMAO réductase inductible d'*E. coli*,

présentent une homologie au niveau de leur séquence primaire (6, 7, 8). La structure globale de la TMAO réductase d'*E. coli* pourrait se rapprocher de celles décrites pour *Rhodobacter sphaeroides* ou *Rhodobacter capsulatus*. Chez *E. coli*, les gènes qui codent pour les différents composants du système TMAO réductase sont organisés en opéron : l'opéron *torCAD*, qui code pour les trois protéines TorC, TorD et TorA (6). Chez *Rhodobacter*, les gènes qui codent pour les différents composants du système TMAO/DMSO réductase sont également organisés en opéron : l'opéron *dorCDA*, qui code pour trois protéines DorC, DorD (également appelé DorB) et DorA, possédant des homologies avec respectivement les protéines TorC, TorD et TorA d'*E. coli* (9, 10).

Une étude phylogénétique par séquençage de l'ADNr 16S a été réalisée sur une bactérie isolée à partir d'un poisson pêché dans la baie de Marseille, et gardé à température ambiante dans de l'eau de mer filtrée. Les résultats obtenus montrent que cette bactérie, qui possède une activité TMAO réductase importante, correspond à une nouvelle espèce du genre *Shewanella*, proche de *Shewanella putrefaciens*. Elle a été appelée *Shewanella massilia*. Excepté la protéine TorE, les produits des gènes de l'opéron *torECAD* de *S. massilia* possèdent de fortes homologies avec les protéines impliquées dans les systèmes TMAO réductase d'*E. coli* et des bactéries du genre *Rhodobacter* (19). De même, la structure globale de la TMAO réductase de *S. massilia* présente des homologies avec les structures déjà décrites des TMAO/DMSO réductases des bactéries du genre *Rhodobacter* (20).

L'altération des chairs de poissons, comme de la plupart des aliments, est essentiellement due à l'activité métabolique de certaines bactéries, pouvant représenter jusqu'à 10^8 cellules par gramme de produit. Les premières modifications *post mortem* qui surviennent au niveau des chairs de poissons ne sont pas nécessairement dues aux bactéries, mais à certaines réactions d'autolyse. Cependant, le développement microbien constitue très vite l'élément majeur de l'altération, le tissu musculaire du poisson constituant un substrat pour la croissance bactérienne. Plusieurs facteurs intrinsèques aux chairs de poissons peuvent expliquer leur très grande altérabilité, comparée à d'autres produits alimentaires : une hydratation importante, un pH *post mortem* élevé (> 6), une forte teneur en substances azotées non protéiques, dont le TMAO forme la part essentielle et, une faible teneur en protéines de soutien (11, 12). Ces différentes caractéristiques contribuent au développement d'une flore microbienne d'altération spécifique des chairs de poissons. De façon intéressante, la diversité des espèces de poissons ne semble pas avoir d'incidence sur la nature ou le nombre de bactéries initialement présentes sur

le poisson. En revanche, la microflore bactérienne du poisson semble directement liée à l'environnement naturel où il évolue. Ainsi, la contamination de l'eau qui dépend essentiellement de la température, la salinité ou la concentration en oxygène dissous, semble jouer un rôle déterminant. L'origine des bactéries retrouvées au niveau des chairs de poissons ne provient pas uniquement de la microflore des poissons vivants : des bactéries contaminantes peuvent notamment provenir de la chaîne du froid (la glace, les récipients contenant les poissons, les étapes de transformation...). Parmi l'ensemble de la flore microbienne retrouvée au niveau des chairs de poissons, une partie seulement est rendue responsable du phénomène de putréfaction. Tandis qu'une contamination bactérienne ne rend pas nécessairement les chairs de poissons impropres à la consommation, certaines bactéries entraînent rapidement des changements désagréables dans la texture, la saveur ou l'odeur dégagée (13).

Les produits de la mer représentent donc une denrée hautement périssable, posant de nombreux problèmes de conservation aux industriels de la pêche. La maîtrise de la qualité fraîcheur de ces produits constitue ainsi une préoccupation de plus en plus importante pour l'ensemble du secteur de la pêche (producteurs, transformateurs ou distributeurs), conduisant depuis quelques années les industriels à rechercher de nouvelles techniques permettant de rendre compte de l'état de fraîcheur du poisson dans des délais très brefs.

Actuellement, la détermination de l'état de fraîcheur des produits de la mer est essentiellement fondée sur une appréciation sensorielle (aspect, odeur, saveur) qui permet au mieux de conclure à un produit frais, moyennement frais ou impropre à la consommation. Cette méthode organoleptique n'est cependant applicable qu'à des produits entiers, et des analyses plus fiables en laboratoire sont souvent indispensables.

Les méthodes basées sur une analyse bactériologique (flore bactérienne totale) applicables à des produits transformés sont de plus en plus utilisées pour apprécier l'état de fraîcheur du poisson. L'estimation directe du nombre de bactéries cultivables sur un échantillon de poisson reste la méthode la plus communément utilisée : après croissance sur différents milieux (par exemple milieu de citrate de fer), chaque cellule va former une colonie visible sur boîtes de pétri, permettant ainsi un dénombrement. Bien que cette technique soit simple d'utilisation et assez sensible, elle nécessite cependant un temps d'incubation pour la croissance important (de 3 à 5 jours environ). De plus, la composition du milieu de croissance, ou les températures retenues pour ces tests (20-30°C), ne permettent pas toujours de détecter l'ensemble des bactéries d'altération. Ainsi, la réglementation actuelle qui préconise une

température de 30°C pour réaliser ces tests (arrêté de 1979), ne permet pas de pouvoir détecter certaines bactéries d'altération comme *Photobacterium phosphoreum* qui ne croissent pas à cette température. Ainsi, même si la mesure non spécifique de la charge microbienne totale constitue un bon indicateur de l'état d'hygiène des poissons, elle ne permet cependant pas d'évaluer la qualité sensorielle de ce type de produit. L'examen microscopique des aliments est une technique rapide pour estimer le niveau de contamination bactérienne. Les cellules colorées à l'acridine orange sont visualisées par une technique de microscopie de fluorescence ; le principal inconvénient de cette méthode reste cependant sa faible sensibilité (entre 10^4 et 10^5 cellules).

- 10 La dégradation des composants cellulaires du poisson conduit à la production de nombreuses substances qui peuvent servir d'indicateur indirect d'une contamination bactérienne. Une alternative aux méthodes énumérées ci-dessus a donc consisté à suivre par des techniques chimiques, différents produits de dégradation des chairs de poissons (14). La détermination de l'azote basique volatile total (ABVT), dont l'ammoniac (NH_3) et la
- 15 triméthylamine (TMA) forment la part essentielle, est une technique largement répandue à l'heure actuelle pour estimer le degré de décomposition des chairs de poissons. Le dosage de l'ABVT a l'avantage d'être simple, rapide et d'un coût de revient très faible. La détermination du taux de TMA dans l'ABVT, permet d'apporter un élément qualitatif supplémentaire au critère ABVT. Ce critère semble en effet moins dépendant de variations qui affectent
- 20 généralement le taux de TMA ou d'ABVT (l'espèce du poisson, sa teneur en graisses etc...). La même méthodologie que pour l'ABVT peut être utilisée pour doser la TMA. D'autres techniques colorimétrique, enzymatique ou chromatographiques ont également été décrites pour quantifier la TMA (15, 16). Lors de la réaction de réduction du TMAO en TMA par les
- 25 bactéries, les chairs de poissons en décomposition subissent différents changements : baisse du potentiel rédox, une augmentation du pH, de la conductivité électrique. Plusieurs études ont donc également utilisé ces différents indicateurs pour tenter de suivre indirectement le dégagement de TMA. Cependant l'ensemble de ces études n'a jamais permis d'établir une corrélation définitive entre le niveau de TMA dégagé et la qualité fraîcheur des échantillons de
- 30 poissons. De nombreux autres produits de dégradation ont également été testés afin de pouvoir déterminer par des dosages chimiques le niveau d'altération du poisson : le sulfure d'hydrogène, l'hypoxanthine, l'indol, l'histamine et les acides aminés. Cependant, ces

différents dosages ne sont significatifs que dans certaines espèces de poissons, ou à un niveau d'altération très avancé.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique moléculaire qui permet d'amplifier de grandes quantités d'une séquence d'ADN cible dans le but de la visualiser. Depuis quelques années, la technique de la PCR est de plus en plus utilisée pour la détection et l'identification de micro-organismes notamment dans le domaine de la bactériologie clinique ou celui de la sécurité des aliments (17, 18). Actuellement, les tests PCR appliqués aux produits alimentaires permettent principalement la détection de bactéries pathogènes bien déterminées (*Shigella*, *Salmonella*, *Listeria* ...).

La présente invention découle de la mise en évidence par les inventeurs du fait que les séquences d'ADN codant pour une protéine du système TMAO réductase, ont une homologie suffisante au sein des diverses bactéries, notamment au sein des bactéries responsables de l'altération des tissus d'organismes aquatiques, et plus particulièrement au sein des bactéries marines, pour permettre la mise en œuvre de procédés de détection de toutes bactéries responsables de l'altération des tissus par leur activité TMAO réductase, lesdits procédés étant applicables sur tout animal aquatique, et notamment sur tout animal marin.

L'un des buts de la présente invention est de fournir un test de qualité fraîcheur des produits aquatiques, et plus particulièrement des produits de la mer, à la fois rapide, peu coûteux, et offrant une fiabilité élevée en terme de spécificité et de sensibilité.

L'un des autres buts de la présente invention est de fournir un test de détection non pas d'un type bactérien, mais de l'ensemble des bactéries responsables de l'altération des tissus d'organismes aquatiques, et notamment de la putréfaction des chairs de poissons, à savoir aussi bien les bactéries marines, que les entérobactéries ou les bactéries isolées au niveau des eaux saumâtres.

Un autre but de la présente invention est de fournir un test de détection de bactéries responsables de l'altération des tissus d'organismes marins, applicable à différentes espèces de poissons provenant de régions géographiques différentes.

Un autre but de la présente invention est de fournir un test de détection de bactéries responsables de l'altération des tissus d'organismes marins, suffisamment sensible pour détecter des étapes précoces de l'altération.

La présente invention a pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques choisies parmi celles comprenant une séquence codant pour une protéine du système triméthylamine N-oxyde

réductase (TMAO réductase) chez les bactéries, ou un fragment de cette séquence telle qu'une sonde ou une amorce d'environ 15 à environ 25 nucléotides, ou une séquence dérivée par addition, suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides de cette séquence codant pour une protéine du système TMAO réductase ou d'un fragment de cette dernière, ledit fragment et ladite séquence dérivée étant capables de s'hybrider avec ladite séquence codant pour une protéine du système TMAO réductase, pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection de la présence de toutes bactéries impliquées dans le processus de dégradation des chairs d'animaux aquatiques, chez un hôte susceptible d'être porteur de telles bactéries.

- Avantageusement, les séquences nucléotidiques codant pour une protéine du système TMAO réductase susmentionnées, sont choisies parmi celles correspondant à l'opéron *torCAD* ou l'opéron *dorCDA* mentionnés ci-dessus, du système TMAO réductase chez les bactéries.

- De préférence, la séquence codant pour une protéine du système TMAO réductase susmentionnée, est choisie parmi les séquences codant pour la TMAO réductase chez les bactéries, encore désignée protéine TorA ou DorA, ou codant pour un cytochrome de type *c* chez les bactéries, encore désigné protéine TorC ou DorC.

Selon un mode particulièrement avantageux de l'invention, les séquences nucléotidiques codant pour une protéine du système TMAO réductase sont choisies parmi celles des bactéries suivantes :

- les bactéries marines, telles que celles du genre *Shewanella*, *Photobacterium* ou *Vibrio*, lesdites séquences étant notamment choisies parmi les suivantes :
 - * la séquence codant pour la protéine TorA de *Shewanella massilia* représentée sur la figure 1,
 - * la séquence codant pour la protéine TorA de *Shewanella putrefaciens* représentée sur la figure 1,
 - * la séquence codant pour la protéine TorA de *Shewanella c* représentée sur la figure 2,
 - * la séquence partielle codant pour la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum* représentée sur la figure 3,
 - * la séquence codant pour la protéine TorC de *Shewanella massilia* représentée sur la figure 14,
- les bactéries provenant des eaux saumâtres, telles que celles du genre *Rhodobacter*, ou *Roseobacter*, lesdites séquences étant notamment choisies parmi les suivantes :

* la séquence codant pour la protéine DorA de *Rhodobacter sphaeroides* représentée sur la figure 4,

* la séquence codant pour la protéine DorA de *Rhodobacter capsulatus* représentée sur la figure 4,

5 * la séquence codant pour la protéine DorC de *Rhodobacter sphaeroides* représentée sur la figure 14,

- les entérobactéries, telles que celles du genre *Escherichia*, ou *Salmonella*, lesdites séquences étant notamment choisies parmi les suivantes :

10 * la séquence codant pour la protéine TorA de *Escherichia coli* représentée sur la figure 4,

* la séquence partielle codant pour la protéine TorA de *Salmonella typhimurium* représentée sur la figure 5,

* la séquence codant pour la protéine TorC de *Escherichia coli* représentée sur la figure 14.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de séquences nucléotidiques choisies parmi les fragments des séquences définies ci-dessus, ou parmi les séquences dérivées de ces fragments, lesdits fragments ou séquences dérivées comprenant environ 15 à 25 nucléotides, et sont utilisés par paires pour former des couples d'amorces permettant l'amplification de fragments de gènes codant pour une protéine du système TMAO-réductase de bactéries impliquées dans la dégradation des chairs d'animaux aquatiques, selon la technique PCR.

Avantageusement, les séquences nucléotidiques susmentionnées sont utilisées sous forme de couples d'amorces choisis parmi l'un quelconque des trois groupes d'amorces suivants :

25 (1) le groupe d'amorces « DDN » amplifiant des fragments d'ADN du gène *torA*, ce groupe comprenant :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN+ » suivantes :

- DDN1+ : 5' CGG vGA yTA CTC bAC hGG TGC 3' : mélange de 54 séquences nucléotidiques,

30 - DDN5+ : 5' ATy GAT GCG ATy CTC GAA CC 3' : mélange de 4 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN- » suivantes :

- DDN2- : 5' CGT Amw sGT CGA kAT CGT TrC GCT C 3' : mélange de 32 séquences

nucléotidiques,

- DDN3- : 5' GAC TCA CAy Awy TGy GAG TG 3' : mélange de 16 séquences

nucléotidiques,

- DDN4- : 5' TGr CCd CGr kCG TTA AAG AC 3' : mélange de 24 séquences

5 nucléotidiques,

- DDN5- : 5' CCv GGT TCG AGr ATC GCA TC 3' : mélange de 6 séquences

nucléotidiques,

(2) le groupe d'amorces « BN » » amplifiant des fragments d'ADN du gène *torA*, ce groupe comprenant :

10 ♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN+ » suivantes :

- BN1+ : 5' C bGA yAT CsT rCT GCC 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,

- BN3+ : 5' GGm GAY TAY TCb ACm GGy GC 3' : mélange de 96 séquences

nucléotidiques,

- BN6+ : 5' Twy GAr CGy AAC GAY mTC GA 3' : mélange de 64 séquences

15 nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN- » suivantes :

- BN2- : 5' GG vyC rTA CCA bsC vCC TTC 3' : mélange de 216 séquences

nucléotidiques,

- BN4- : 5' ATC Arr CCn swv GGC GTG CC 3' : mélange de 192 séquences

20 nucléotidiques,

- BN5- : 5' GbC ACr TCd GTy TGy GG 3' : mélange de 72 séquences nucléotidiques,

(3) le groupe d'amorces « BC » » amplifiant des fragments d'ADN du gène *torC*, ce

groupe comprenant :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC+ » suivantes :

25 - BC1+ : 5' ACn CCn GAr AAr TTy GAr GC 3' : mélange de 256 séquences

nucléotidiques,

- BC2+ : 5' TGy ATTh GAY TGy CAy AAr GG 3' : mélange de 96 séquences

nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC- » suivantes :

30 - BC2- : 5' CCy TTr TGr CAr TCd ATr CA 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

- BC3- : 5' TTn GCr TCr AAr TGn GC 3' : mélange de 128 séquences nucléotidiques,

dans lesquelles $n = (A, C, G, T)$, $y = (C, T)$, $r = (A, G)$, $h = (A, C, T)$, $d = (G, A, T)$, $m = (A, C)$, $w = (A, T)$, $b = (G, T, C)$, $s = (G, C)$, $v = (G, A, C)$, et $k = (G, T)$,

les couples d'amorces étant choisis de telle sorte que l'une des amorces d'un couple correspond à l'une des compositions de séquences nucléotidiques DDN+, BN+ ou BC+ susmentionnées, tandis que l'autre amorce correspond respectivement à l'une des compositions de séquences nucléotidiques DDN-, BN- ou BC- susmentionnées, lesdits couples d'amorces étant notamment choisis parmi l'un quelconque des quatre couples suivants :

(a) le couple DDN1+ / DDN5-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 820 paires de bases (bp), et notamment à l'amplification d'un fragment de 821 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 821 bp délimité par les nucléotides situés aux positions 620 à 1450 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

(b) le couple BN6+ / BN2-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 710 bp, et notamment à l'amplification d'un fragment de 727 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 727 bp délimité par les nucléotides situés aux positions 1657 à 2403 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

(c) le couple BN6+ / BN4-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 360 bp, et notamment à l'amplification d'un fragment de 355 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 355 bp délimité par les nucléotides situés aux positions 1657 à 2023 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

(d) le couple BC1+ / BC2-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorC chez les bactéries, d'une taille d'environ 170 bp, et notamment à l'amplification d'un fragment de 197 bp du gène codant pour la protéine TorC chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 197 bp codant pour le fragment polypeptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 114 à 179 de la protéine TorC de *S. massilia* représentée sur la figure 14.

Les hôtes susceptibles d'être porteurs de bactéries impliquées dans le processus de dégradation des chairs d'animaux aquatiques, telles que décrites ci-dessus, sont des organismes aquatiques, notamment des organismes marins tels que les poissons et les crustacés, et plus

particulièrement les poissons d'Atlantique tels que la sole, le cabillaud, ou les poissons de la mer Méditerranée tels que le rouget de roche, la dorade, ainsi que certains animaux des eaux douces ou saumâtres.

5 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de séquences nucléotidiques décrites ci-dessus, pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection de la présence de toutes bactéries impliquées dans la dégradation des chairs d'animaux aquatiques, dans le cadre d'un procédé d'évaluation de l'état de fraîcheur des animaux aquatiques sur lesquels est prélevé l'échantillon testé, lorsque ces derniers sont extraits de leur environnement naturel.

10 L'invention concerne également toute séquence nucléotidique correspondant à l'une des séquences suivantes :

- DDN1+ : 5' CGG vGA yTA CTC bAC hGG TGC 3',
- DDN5+ : 5' ATy GAT GCG ATy CTC GAA CC 3',
- DDN2- : 5' CGT Amw sGT CGA kAT CGT TrC GCT C 3',
- 15 - DDN3- : 5' GAC TCA CAy Awy TGy GAG TG 3',
- DDN4- : 5' TGr CCd CGr kCG TTA AAG AC 3',
- DDN5- : 5' CCv GGT TCG AGr ATC GCA TC 3',
- BN1+ : 5' C bGA yAT CsT rCT GCC 3',
- BN3+ : 5' GGm GAY TAY TCb ACm GGy GC 3',
- 20 - BN6+ : 5' Twy GAr CGy AAC GAY mTC GA 3',
- BN2- : 5' GG vyC rTA CCA bsC vCC TTC 3',
- BN4- : 5' ATC Arr CCn swv GGC GTG CC 3',
- BN5- : 5' GbC ACr TCd GTy TGy GG 3',
- BC1+ : 5' ACn CCn GAr AAr TTy GAr GC 3',
- 25 - BC2+ : 5' TGy ATh GAY TGy CAy AAr GG 3',
- BC2- : 5' CCy TTr TGr CAr TCd ATr CA 3',
- BC3- : 5' TTn GCr TCr AAr TGn GC 3',

dans lesquelles n = (A,C,G,T), y = (C,T), r = (A,G), h = (A,C,T), d = (G,A,T), m = (A,C), w = (A,T), b = (G,T,C), s = (G,C), v = (G,A,C), et k = (G,T).

30 L'invention a également pour objet toute composition de séquences nucléotidiques en mélange, correspondant à l'une des compositions suivantes :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN+ » suivantes :

- DDN1+ : 5' CGG vGA yTA CTC bAC hGG TGC 3' : mélange de 54 séquences nucléotidiques,

5 - DDN5+ : 5' ATy GAT GCG ATy CTC GAA CC 3' : mélange de 4 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN- » suivantes :

- DDN2- : 5' CGT Amw sGT CGA kAT CGT TrC GCT C 3' : mélange de 32 séquences nucléotidiques,

10 - DDN3- : 5' GAC TCA CAy Awy TGy GAG TG 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,

- DDN4- : 5' TG_r CC_d CG_r kCG TTA AAG AC 3' : mélange de 24 séquences nucléotidiques,

- DDN5- : 5' CC_v GGT TCG AG_r ATC GCA TC 3' : mélange de 6 séquences nucléotidiques,

15 ♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN+ » suivantes :

- BN1+ : 5' C bGA yAT CsT rCT GCC 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,

- BN3+ : 5' GG_m GAy TAy TC_b AC_m GGy GC 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

20 - BN6+ : 5' Twy GAR CGy AAC GAy mTC GA 3' : mélange de 64 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN- » suivantes :

- BN2- : 5' GG vyC rTA CCA bsC vCC TTC 3' : mélange de 216 séquences nucléotidiques,

25 - BN4- : 5' ATC Arr CC_n swv GGC GTG CC 3' : mélange de 192 séquences nucléotidiques,

- BN5- : 5' GbC AC_r TC_d GTy TGy GG 3' : mélange de 72 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC+ » suivantes :

- BC1+ : 5' AC_n CC_n GAR AAr TTy GAR GC 3' : mélange de 256 séquences nucléotidiques,

30 - BC2+ : 5' TGy ATh GAy TGy CAy AAr GG 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC- » suivantes :

- BC2- : 5' CCy TTr TGr CAr TCd ATr CA 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

- BC3- : 5' TTn GCr TCr AAr TGn GC 3' : mélange de 128 séquences nucléotidiques,

dans lesquelles n = (A,C,G,T), y = (C,T), r = (A,G), h = (A,C,T), d = (G,A,T), m = (A,C),

5 w = (A,T), b = (G,T,C), s = (G,C), v = (G,A,C), et k = (G,T).

L'invention concerne également les couples d'amorces choisis au sein de l'un des groupes d'amorces suivants :

(1) le groupe d'amorces « DDN » comprenant :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN+ » suivantes :

10 - DDN1+ : 5' CGG vGA yTA CTC bAC hGG TGC 3' : mélange de 54 séquences nucléotidiques,

- DDN5+ : 5' ATy GAT GCG ATy CTC GAA CC 3' : mélange de 4 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN- » suivantes :

15 - DDN2- : 5' CGT Amw sGT CGA kAT CGT TrC GCT C 3' : mélange de 32 séquences nucléotidiques,

- DDN3- : 5' GAC TCA CAy Awy TGy GAG TG 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,

- DDN4- : 5' TGr CCd CGr kCG TTA AAG AC 3' : mélange de 24 séquences

20 nucléotidiques,

- DDN5- : 5' CCv GGT TCG AGr ATC GCA TC 3' : mélange de 6 séquences nucléotidiques,

(2) le groupe d'amorces « BN » comprenant :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN+ » suivantes :

25 - BN1+ : 5' C bGA yAT CsT rCT GCC 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,

- BN3+ : 5' GGm GAY TAY TCb ACm GGy GC 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

- BN6+ : 5' Twy GAr CGy AAC GAY mTC GA 3' : mélange de 64 séquences nucléotidiques,

30 ♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN- » suivantes :

- BN2- : 5' GG vyC rTA CCA bsC vCC TTC 3' : mélange de 216 séquences nucléotidiques,

- BN4- : 5' ATC Arr CCn swv GGC GTG CC 3' : mélange de 192 séquences nucléotidiques,

- BN5- : 5' GbC ACr TCd GTy TGy GG 3' : mélange de 72 séquences nucléotidiques,

(3) le groupe d'amorces « BC » comprenant :

5 ♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC+ » suivantes :

- BC1+ : 5' ACn CCn GAr AAr TTy GAr GC 3' : mélange de 256 séquences nucléotidiques,

- BC2+ : 5' TGy ATTh GAY TGy CAy AAr GG 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

10 ♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC- » suivantes :

- BC2- : 5' CCy TTr TGr CAr TCd ATr CA 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

- BC3- : 5' TTh GCr TCr AAr TGn GC 3' : mélange de 128 séquences nucléotidiques,
dans lesquelles n = (A,C,G,T), y = (C,T), r = (A,G), h = (A,C,T), d = (G,A,T), m = (A,C),
w = (A,T), b = (G,T,C), s = (G,C), v = (G,A,C), et k = (G,T),

15 les couples d'amorces étant choisis de telle sorte que l'une des amorces d'un couple correspond à l'une des compositions de séquences nucléotidiques DDN+, BN+ ou BC+ susmentionnées, tandis que l'autre amorce correspond respectivement à l'une des compositions de séquences nucléotidiques DDN-, BN- ou BC- susmentionnées, lesdits couples d'amorces étant notamment choisis parmi l'un quelconque des quatre couples suivants :

20 (a) le couple DDN1+ / DDN5-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 820 paires de bases (bp), et notamment à l'amplification d'un fragment de 821 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 821 bp délimité par les nucléotides situés aux positions 620 à 1450 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

25 4,
(b) le couple BN6+ / BN2-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 710 bp, et notamment à l'amplification d'un fragment de 727 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 727 bp délimité par les nucléotides situés aux positions 1657 à 2403 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

30 (c) le couple BN6+ / BN4-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 360 bp, et notamment à

l'amplification d'un fragment de 355 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 355 bp délimité par les nucléotides situés aux positions 1657 à 2023 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

(d) le couple BC1+ /BC2-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorC chez les bactéries, d'une taille d'environ 170 bp, et notamment à l'amplification d'un fragment de 197 bp du gène codant pour la protéine TorC chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 197 bp codant pour le fragment polypeptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 114 à 179 de la protéine TorC de *S. massilia* représentée sur la figure 14.

10 L'invention a également pour objet une méthode de détection de toutes bactéries impliquées dans la dégradation des chairs d'animaux aquatiques chez un hôte susceptible d'être porteur de telles bactéries, ladite méthode étant effectuée à partir d'un échantillon biologique prélevé sur cet hôte, cet échantillon biologique correspondant notamment à un fragment sous-cutané de chair de l'animal aquatique en question, et étant caractérisée en ce qu'elle comprend

15 une étape d'hybridation d'au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, avec des fragments de gènes codant pour une protéine du système TMAO-réductase de bactéries impliquées dans la dégradation des chairs d'animaux aquatiques susceptibles d'être présentes dans l'échantillon biologique prélevé sur ledit hôte, suivie d'une étape de révélation, notamment par électrophorèse, de la présence éventuelle dans ledit échantillon de gènes codant pour une

20 protéine du système TMAO-réductase, ou de fragments de ces gènes, dont le nombre de copies a été le cas échéant amplifié.

L'invention a plus particulièrement pour objet une méthode de détection telle que définie ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- le traitement d'un échantillon biologique prélevé sur cet hôte afin d'extraire l'ADN total de cet hôte et de rendre le génome de ces bactéries accessible aux séquences nucléotidiques ou amorces définies ci-dessus, ce traitement étant notamment effectué à l'aide d'une technique d'extraction rapide de l'ADN basée sur la fixation des acides nucléiques à des billes de silice,
- l'amplification du nombre de copies de gènes codant pour les protéines du système TMAO-réductase de bactéries impliquées dans la dégradation des chairs d'animaux aquatiques, ou de fragments de ces gènes, susceptibles d'être présents dans cet échantillon, à l'aide des séquences nucléotidiques ou amorces susmentionnées,
- la détection de la présence éventuelle d'un nombre amplifié de copies de gènes codant

pour une protéine du système TMAO-réductase des bactéries susmentionnées, ou de fragments de ces gènes, et donc de la présence de telles bactéries dans l'échantillon biologique étudié.

Avantageusement, les méthodes de détection selon l'invention, sont caractérisées en ce que l'amplification du nombre de gènes codant pour les protéines du système TMAO-réductase comprend les étapes suivantes :

- la prédénaturation de l'ADN double brin total de l'hôte en ADN mono-brin, de préférence dans un tampon constitué de 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,01 % de gélatine, des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) à une concentration de 100 µM chacun, et des couples d'amorces, tels que définis ci-dessus, par chauffage entre environ 90 °C et environ 100 °C, avantageusement à 94 °C, pendant environ 1,5 minute,

- l'amplification proprement dite par addition au milieu obtenu à l'étape précédente d'ADN polymérase, par exemple la Taq polymérase,

♦ chauffage à environ 94°C pendant environ 30 secondes, ce qui correspond à l'étape de dénaturation proprement dite,

♦ puis chauffage entre environ 35°C à environ 60 °C, et notamment à environ 45°C ou 55°C, pendant environ 30 secondes, ce qui correspond à l'étape d'hybridation des amorces avec les gènes codant pour les protéines du système TMAO-réductase de bactéries, ou des fragments de ces gènes, susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique étudié,

♦ et enfin, chauffage à 72 °C, pendant environ 45 secondes, ce qui correspond à l'étape d'élongation des amorces, hybridées à l'étape précédente, l'une vers l'autre, produisant ainsi des séquences nucléotidiques complémentaires de fragments des gènes codant pour les protéines du système TMAO-réductase de bactéries, ces dernières séquences étant délimitées par les nucléotides s'hybridant avec les amorces susmentionnées,

- la répétition de l'étape d'amplification précédente entre environ 15 et environ 35 fois, avantageusement environ 30 fois.

L'invention concerne également les trousseaux ou kits pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection susmentionnée, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

- une ou plusieurs séquences nucléotidiques ou amorces telles que définies ci-dessus,

- une ADN polymérase,

- un milieu réactionnel avantageusement constitué de 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,01 % de gélatine, des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP,

dATP, dGTP, dTTP) à une concentration de 100 μ M chacun.

L'invention concerne également toute séquence nucléotidique comprenant :

- la séquence représentée sur la figure 2 du gène *torA* codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Shewanella C*,

5 - ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour la protéine TorA de *Shewanella C*, dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 6,

10 - ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 2,

- ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides.

15 L'invention a également pour objet toute séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 2, et comprenant :

- la séquence en acides aminés représentée sur la figure 6 de la protéine TorA de *Shewanella C*,

20 - ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 6,

25 - ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 5 acides aminés.

L'invention concerne également toute séquence nucléotidique comprenant :

- la séquence partielle représentée sur la figure 3 du gène codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Photobacterium phosphoreum*,

30 - ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour le fragment de la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum* dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 7,

- ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par

substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 3,

- 5 - ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides.

L'invention concerne également toute séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur le figure 3, et comprenant :

- 10 - la séquence partielle en acides aminés représentée sur la figure 7 de la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum*,

- ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 3bis,

- 15 - ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 5 acides aminés.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique comprenant :

- 20 - la séquence partielle représentée sur la figure 5 du gène codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Salmonella typhimurium*,

- ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour la protéine TorA de *Salmonella typhimurium* dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 8,

- 25 - ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 5,

- 30 - ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides.

L'invention concerne également toute séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 5, et comprenant :

- la séquence en acides aminés représentée sur la figure 8 de la protéine TorA de *Salmonella typhimurium*,

- ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 5bis,

- ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 5 acides aminés.

10 L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'obtention d'amorces de l'invention, et de leur utilisation pour la mise en oeuvre d'un procédé de détection selon l'invention.

Description des figures

- la figure 1 représente l'alignement des séquences nucléotidiques des gènes *torA* de *Shewanella massilia* (*torA/S.m.*), de *Shewanella C* (*torA/S.c.*), et de *Shewanella putrefaciens* (*torA/S.p.*).

- la figure 2 représente la séquence nucléotidique complète du gène *torA* codant pour la TMAO réductase de *Shewanella C*.

- la figure 3 représente la séquence nucléotidique partielle du gène *torA* codant pour la TMAO réductase de *Photobacterium phosphoreum*.

- la figure 4 représente l'alignement des séquences nucléotidiques des gènes *torA* de *Shewanella massilia* (*torA/S.m.*), de *E. coli* (*torA/E. c.*), de *Rhodobacter sphaeroides* (*TorA/R.s.*), et *Rhodobacter capsulatus* (*TorA/R.c.*). Les flèches indiquent la position des différentes amorces sur le gène *torA* de la bactérie *Shewanella massilia*, élaborées à partir des régions conservées. Plus particulièrement, les positions des différentes amorces « DDN » et « BN » sur le gène *torA* de *S. massilia* sont les suivantes :

DDN1+ : 620

BN1+ : 1628

DDN5+ : 1428

BN3+ : 621

DDN2- : 1684

BN6+ : 1657

DDN3- : 2201

BN2- : 2403

DDN4- : 2325

BN4- : 2023

DDN5- : 1450

BN5- : 946

- la figure 5 représente la séquence nucléotidique partielle du gène *torA* codant pour la TMAO réductase de *Salmonella typhimurium*.

- la figure 6 représente la séquence peptidique complète de la TMAO réductase de *Shewanella c.*

5 - la figure 7 représente l'alignement des séquences peptidiques du fragment de la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum* (TorA/P.p.), déduit du fragment d'ADN amplifié chez *P. phosphoreum* à l'aide des amorces moléculaires DDN1+/DDN5-, avec les régions protéiques correspondantes des protéines TorA de *Shewanella massilia* (TorA/S.m.), de *E. coli* (TorA/E.c.), et de *Rhodobacter sphaeroides* (DorA/R.s.).

10 - la figure 8 représente l'alignement des séquences peptidiques du fragment de la protéine TorA de *Salmonella typhimurium* (TorA/S.t.), déduit du fragment d'ADN amplifié chez *S. typhimurium* à l'aide des amorces moléculaires DDN1+/DDN5-, avec les régions protéiques correspondantes de la protéine TorA de *E. coli* (TorA/E. c.), de la protéine DorA de *Rhodobacter sphaeroides* (DorA/R.s.), et de la protéine TorA de *Shewanella massilia* (TorA/S.m.).

15 - la figure 9 représente l'alignement de séquences nucléiques d'une région très conservée du gène qui code pour la TMAO réductase des bactéries du genre *Shewanella* et de *E. coli*, utilisée pour l'élaboration d'une des amorces moléculaires « DDN » selon l'invention.

(a) Position approximative et orientation des différentes amorces DDN sur le gène *torA* codant pour la TMAO réductase de différentes bactéries du genre *Shewanella* et de *E. coli*,

(b) Exemple de stratégie d'élaboration d'une des amorces DDN (DDN1+); la zone encadrée correspond à une région nucléique très conservée du gène qui code pour la TMAO réductase des bactéries du genre *Shewanella* [*Shewanella massilia* (*torA/S. massilia*), *Shewanella putrefaciens* (*torA/S. putrefaciens*), *Shewanella c* (*torA/S. c*)]. et de *E. coli*.

25 - la figure 10 représente l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR lorsque l'amplification est réalisée à partir de l'ADN chromosomique de *Shewanella massilia* (pistes 1, 2, 3 et 4), de *Shewanella c* (pistes 5, 6, 7 et 8) et de *Shewanella putrefaciens* MR-1 (pistes 9, 10, 11 et 12) en utilisant les amorces moléculaires DDN1+/DDN5- (pistes 1, 5 et 9 ; taille attendue : 820 pb), DDN5+/DDN2- (pistes 2, 6 et 10 ; taille attendue : 234 pb), DDN5+/DDN3- (pistes 3, 7 et 11 ; taille attendue : 740 pb), DDN5+/DDN4- (pistes 4, 8 et 12 ; taille attendue : 866 pb). Pistes M : Marqueurs de taille.

30 - la figure 11 représente l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR lorsque

l'amplification est réalisée à partir de l'ADN chromosomique de *Photobacterium phosphoreum* en utilisant les couples d'amorces DDN1+/DDN5- (piste 1 ; taille attendue : 820 pb), DDN5+/DDN2- (piste 2 ; taille attendue : 234 pb), DDN5+/DDN3- (piste 3 ; taille attendue : 740 pb) et DDN5+/DDN4- (piste 4 : taille attendue : 866 pb). Pistes M : marqueurs de taille.

5 - la figure 12 représente l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de la PCR lorsque l'amplification est réalisée à partir de l'ADN chromosomique de *S. massilia* (pistes 1, 4, 7 et 10), de *E. coli* (pistes 2, 5, 8 et 11) et de *S. typhimurium* (pistes 3, 6 et 9), en utilisant les couples d'amorces moléculaires DDN1+/DDN5- (pistes 1 à 3 ; taille attendue : 820 pb), DDN5+/DDN2- (pistes 4 à 6 ; taille attendue : 234 pb), DDN5+/DDN3- (pistes 7 à 9 ; taille attendue : 740 pb), DDN5+/DDN4- (pistes 10 et 11 ; taille attendue : 866 pb). Pistes M : Marqueurs de taille.

10 - la figure 13 représente l'alignement de séquences nucléiques d'une région très conservée du gène qui code pour la TMAO réductase des bactéries du genre *Shewanella*, *Rhodobacter* et de *E. coli*, utilisée pour l'élaboration d'une des amorces moléculaires « BN » selon l'invention.

15 (a) Position approximative et orientation des différentes amorces BN sur le gène *torA* codant pour la TMAO réductase de différentes bactéries du genre *Shewanella*, *Rhodobacter* et *E. coli*,

20 (b) Exemple de stratégie d'élaboration d'une des amorces BN (BN3+); la zone encadrée correspond à une région nucléique très conservée du gène qui code pour la TMAO réductase des bactéries *Shewanella massilia* (*torA/S. massilia*), de *E. coli*, de *Rhodococcus sphaeroides* (*dorA/R. sphaeroides*), et de *Rhodococcus capsulatus* (*dorA/R. capsulatus*).

25 - la figure 14 représente l'alignement de séquences protéiques du cytochrome TorC de *S. massilia* (TorC/S.m.), de *E. coli* (TorC/E.c.) et du cytochrome DorC de *R. sphaeroides* (DorC/R.s.). Les flèches indiquent la position des différentes amorces sur le gène *torC* de la bactérie *Shewanella massilia*, élaborées à partir des régions conservées. A titre d'exemple, le couple BC1+/BC2- conduit à l'amplification du fragment d'une taille de 197 bp du gène codant pour la protéine TorC chez *S. massilia*, ce fragment codant pour le polypeptide de 66 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 114 et 179 de la séquence peptidique de TorC de *S. massilia*. Le couple BC1+/BC3- conduit à l'amplification du fragment d'une
30 taille de 719 bp du gène codant pour la protéine TorC chez *S. massilia*, ce fragment codant pour le polypeptide de 240 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 114 et

353 de la séquence peptidique de TorC de *S. massilia*. Le couple BC2+/BC3- conduit à l'amplification du fragment d'une taille de 542 bp du gène codant pour la protéine TorC chez *S. massilia*, ce fragment codant pour le polypeptide de 181 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 173 et 353 de la séquence peptidique de TorC de *S. massilia*.

5 - la figure 15 représente l'électrophorèse sur gel d'agarose (2%) des produits de la PCR lorsque l'amplification est réalisée à partir de l'ADN chromosomique de *E. coli* (piste 1), de *S. typhimurium* (piste 2), de *P. phosphoreum* (piste 3), de *S. massilia* (piste 4), de *R. sphaeroides* (piste 5), ou d'*Erwinia chrysanthemi* (piste 6) en utilisant les amorces moléculaires BC1+ et BC2-. La taille du fragment d'ADN attendue (177 paires de bases) est indiquée par une flèche.

10 Pistes M : Marqueurs de taille.

- la figure 16 représente l'influence de l'ADN chromosomique de poisson sur la spécificité des amorces moléculaires selon l'invention. L'amplification PCR est réalisée à l'aide des amorces moléculaires DDN1+ et DDN5- en présence de 2,5 µg (Pistes 1 et 4), 5 µg (Pistes 2 et 5), ou 10 µg (Pistes 3 et 6) d'ADN chromosomique purifié de Hareng. Les pistes 4, 5 et 6 correspondent aux essais réalisés en ajoutant 2,5 µl de suspension cellulaire de *Shewanella massilia* au mélange réactionnel. Pistes M : marqueurs de taille.

15 - la figure 17 représente l'électrophorèse en gel d'agarose (2%) des produits de la PCR lorsque l'amplification est réalisée à partir d'ADN total extrait à partir de chairs de poissons en décomposition (cabillaud : piste 1 à 3 ; sole : piste 4 à 6 ; dorade : piste 7 à 9 et rouget de roche : piste 10 à 12) à l'aide des amorces BN6+/BN4- (pistes 1, 4, 7 et 10, taille attendue : 364 pb), amorces BN6+/BN2- (pistes 2, 5, 8 et 11, taille attendue : 711 pb), amorces DDN1+/DDN5- (pistes 3, 6, 9 et 12, taille attendue : 820 pb). Pistes M : standard de taille (échelle 1 Kb de BRL).

20 - la figure 18 représente l'électrophorèse sur gel d'agarose (2%) des produits de la PCR lorsque l'amplification est réalisée à l'aide des amorces moléculaires BC1+/BC2- sur deux préparations différentes d'ADN total d'un rouget de roche en voie de putréfaction (piste 1 et 2). La flèche indique le fragment d'ADN amplifié de 177 paires de bases.

25 - la figure 19 représente l'alignement des séquences nucléotidiques des gènes *torA* de *Photobacterium phosphoreum* (*torA/P.p.*), de *Shewanella putrefaciens* (*torA/S.p.*), de *Shewanella massilia* (*torA/S.m.*), de *Shewanella c* (*torA/S.c.*), et de *Salmonella typhimurium* (*torA/S.t.*).

A) METHODES D'ETUDES

Elaboration d'amorces spécifiques à partir du gène codant pour l'enzyme TMAO réductase : sondes moléculaires « DDN », « BN » et « BC ».

5 La première étape de l'étude ci-dessous porte sur l'élaboration d'amorces (ou sondes) moléculaires utilisables pour une réaction PCR, et sur l'étude de leur spécificité pour différentes bactéries impliquées dans l'altération des chairs de poisson. La deuxième étape porte sur l'application de la technique PCR sur des chairs de poisson.

10 D) Elaboration et validation d'amorces moléculaires servant à la réaction PCR.

Le choix des amorces nucléotidiques est une étape critique pour la réussite d'un test PCR. Ces amorces doivent être élaborées à partir de régions hautement conservées du gène qui code pour la TMAO réductase chez l'ensemble des bactéries responsables de la dégradation des chairs de poissons. Plusieurs stratégies ont été utilisées pour élaborer ces amorces.

15 (1) Amorces moléculaires élaborées à partir de régions du gène *torA* conservées chez les bactéries du genre *Shewanella* et chez *E. coli* : amorces « DDN ».

L'élaboration d'amorces très peu dégénérées à partir de régions protéiques conservées est très difficile en raison de la dégénérescence du code génétique.

20 Les amorces moléculaires, appelées « DDN », ont été définies à partir de l'alignement de séquences nucléiques du gène *torA* des différentes bactéries du genre *Shewanella* et d'*E. coli* (Figure 9). En effet, plusieurs régions d'ADN du gène *torA* chez ces bactéries présentent un degré d'identité de séquence élevé avec très peu de mésappariements.

Les amorces moléculaires DDN sont les amorces moléculaires DDN1+, DDN2-, DDN3-, DDN4-, DDN5- et DDN5+ telles que définies ci-dessus.

25 Pour l'ensemble des réactions PCR, la température d'appariement est portée à 55°C afin de rendre l'amplification plus spécifique et donc de limiter l'apparition de bandes d'ADN contaminantes. Ceci est rendu possible par la faible dégénérescence des amorces nouvellement synthétisées. L'amplification PCR met en jeu 30 cycles de réactions successives. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s, une étape d'hybridation à 45°C
30 pendant 30 s et une étape d'élongation à 72°C pendant 45 s.

a) Utilisation des amorces moléculaires DDN pour la détection du système TMAO réductase des bactéries du genre *Shewanella*.

La première série d'expériences, utilisant les couples d'amorces DDN1+/DDN5-, DDN5+/DDN2-, DDN5+/DDN3-, DDN5+/DDN4-, a été réalisée sur l'ADN chromosomique de la souche *Shewanella massilia* (*S. massilia*). Les couples d'amorces DDN1+/DDN2-, DDN1+/DDN3- et DDN1+/DDN4- ont volontairement été écartés du fait de l'éloignement de leurs positions sur le gène *torA*.

Les résultats, regroupés dans la figure 10 (pistes 1 à 4), révèlent pour la majorité des couples d'amorces moléculaires utilisés, l'amplification d'un fragment unique d'ADN spécifique à la taille attendue. Bien que pour le couple d'amorces DDN5+/DDN2- (piste 2), un fragment d'ADN non spécifique, supplémentaire d'environ 300 paires de base, soit amplifié, les amorces moléculaires DDN se révèlent être spécifiques du système TMAO réductase de *S. massilia*.

Les couples d'amorces DDN ont ensuite été testés sur d'autres bactéries appartenant au genre *Shewanella*. La même série d'expériences a été réalisée en utilisant comme matrice l'ADN chromosomique de la souche *Shewanella c* et *S. putrefaciens* MR-1. L'ensemble des couples d'amorces permet d'amplifier un fragment d'ADN spécifique à la taille attendue pour ces deux bactéries (figure 10).

Les différents couples d'amorces DDN permettent donc de détecter l'ensemble des bactéries *Shewanella* testées.

b) Utilisation des amorces moléculaires DDN pour la détection du gène codant pour la TMAO réductase chez la bactérie marine *Photobacterium phosphoreum*, et pour la mise en oeuvre du séquençage dudit gène.

Photobacterium phosphoreum (*P. phosphoreum*) est une bactérie qui comme *S. putrefaciens* est dans un certain nombre de cas rendue responsable de l'altération des chairs de poissons marins (12, 21). Elle appartient à la famille des *Vibrionaceae*, et possède une température optimale de croissance de 15°C. C'est une bactérie très peu étudiée, dont le système TMAO réductase putatif est absolument inconnu à ce jour.

Afin de vérifier la spécificité des amorces moléculaires selon l'invention sur des bactéries distinctes du groupe des *Shewanella*, et susceptibles de contaminer les chairs de poissons, une souche *P. phosphoreum* de collection a été obtenue par l'ATCC (American Type Culture Collection n° 11040). Les premiers essais de croissance réalisés sur cette bactérie sur milieu

marin (Difco) à 15°C ont montré que l'ajout de TMAO au milieu de culture améliore de façon significative sa vitesse de croissance. La densité optique (DO_{600}) obtenue après 24 heures de croissance est de 0,28 pour la souche cultivée en absence de TMAO, et de 0,47 pour la souche cultivée en présence de TMAO. Ce résultat est en accord avec la présence d'une TMAO réductase respiratoire chez *P. phosphoreum*. Une amplification génique a été réalisée à partir de l'ADN chromosomique de cette bactérie (préparé à partir de 10 ml de culture en milieu marin) en utilisant l'ensemble des couples d'amorces moléculaires DDN.

Les résultats, présentés dans la figure 11, montrent que les amorces DDN permettent dans tous les cas l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique. Les différentes tailles de fragments d'ADN sont en accord avec celles obtenues pour l'amplification réalisée sur le chromosome des bactéries du genre *Shewanella*.

Afin de confirmer que le fragment d'ADN amplifié chez *P. phosphoreum* correspond bien à une partie du gène codant pour la TMAO réductase de *P. phosphoreum*, le séquençage dudit fragment a été réalisé. Ainsi, le séquençage d'environ 600 nucléotides du fragment amplifié à partir du couple d'amorces moléculaires DDN1+/DDN5- a été réalisé. Le produit PCR directement purifié par Geneclean (Bio101) a été séquencé par la technique de terminaison des chaînes (22) en utilisant l'amorce moléculaire DDN1+. La séquence protéique déduite de cette séquence nucléique a été alignée avec celles de diverses TMAO réductases (figure 7). Cette séquence protéique présente environ 60 % d'identité avec une région de la TMAO réductase de *S. massilia*. Les homologues observées sont suffisamment élevées pour conclure que le fragment d'ADN séquencé correspond bien à une partie du gène qui code pour la TMAO réductase de *P. phosphoreum*.

Ces résultats mettent en évidence la présence d'un système TMAO réductase chez la bactérie *P. phosphoreum*, et valident la méthode de détection selon l'invention par le test PCR, puisque ce dernier permet de détecter le système TMAO-réductase chez des bactéries d'altération relativement éloignées du point de vue phylogénétique.

c) Utilisation des amorces moléculaires DDN pour la détection de gènes codant pour la TMAO réductase d'entérobactéries, et pour la mise en oeuvre du séquençage desdits gènes.

Afin de vérifier que le test PCR est valide pour la détection d'entérobactéries telle que *E. coli* ou certaines bactéries pathogènes comme *Salmonella typhimurium*, la même expérience PCR que celle décrite ci-dessus a été réalisée, avec comme ADN matrice de l'ADN

chromosomique de *E. coli* et de *S. typhimurium*.

Chez *S. typhimurium*, la région promotrice du système TMAO réductase a pu être mise en évidence par une approche PCR (23).

Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 12. Les quatre couples d'amorces moléculaires DDN1+/DDN5-, DDN5+/DDN2-, DDN5+/DDN3- et DDN5+/DDN4- permettent l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique chez *E. coli* (piste 2, 6, 10 et 16). Dans le cas de *S. typhimurium*, le couple d'amorces DDN1+/DDN5- permet également l'amplification d'un fragment d'ADN, de 820 paires de bases, compatible avec un fragment spécifique du système TMAO réductase (piste 3).

Afin de confirmer que le fragment d'ADN amplifié chez *S. typhimurium* correspond bien à une partie du gène codant pour la TMAO réductase de *S. typhimurium*, le séquençage dudit fragment a été réalisé. La séquence protéique, déduite à partir d'une partie de ce fragment d'ADN (477 nucléotides), possède d'importantes homologues avec la séquence protéique de diverses TMAO réductases (figure 8). Elle présente en outre plus de 88 % d'identité avec la séquence de la TMAO réductase d'*E. coli* et 45 % avec celle de l'enzyme chez *S. massilia*. Le fragment d'ADN amplifié à l'aide des amorces DDN1+/DDN5- correspond donc vraisemblablement à une partie du gène qui code pour la TMAO réductase de *S. typhimurium*.

d) Conclusion

Ainsi que cela a été précédemment décrit, le couple d'amorces DDN1+/DDN5- permet de détecter le gène *torA* des bactéries marines (*Shewanella* et *P. phosphoreum*), mais également des entérobactéries (*E. coli* et *S. typhimurium*).

Les mêmes tests PCR ont été réalisés sur des bactéries isolées au niveau des eaux saumâtres (*Rhodobacter*) qui peuvent éventuellement être retrouvées au niveau des chairs de poissons. Afin de réaliser ces tests, des échantillons d'ADN chromosomique de la bactérie *R. sphaeroides* ont été utilisés comme ADN matrice.

La bactérie *R. sphaeroides* possède un système DMSO/TMAO réductase proche de celui décrit chez *E. coli* (9, 10). Bien que l'enzyme terminale de cette bactérie puisse réduire indifféremment le TMAO et le DMSO, elle possède de nombreuses homologues de séquences protéiques avec la TMAO réductase d'*E. coli* ou *S. massilia* (respectivement 47,5% et 45% d'identité).

Cependant, les tests PCR réalisés avec les sondes moléculaires DDN n'ont pas permis d'amplifier un fragment d'ADN correspondant au gène de la TMAO réductase de cette bactérie.

(2) Amorces moléculaires élaborées à partir de régions du gène *torA* conservées chez l'ensemble des bactéries étudiées : amorces « BN ».

5 Afin d'élargir encore le spectre de détection des amorces moléculaires du test PCR, la séquence nucléique du gène de la TMAO/DMSO réductase des bactéries du genre *Rhodobacter* (*R. sphaeroides* et *R. capsulatus*) a été intégrée à l'alignement réalisé à partir des séquences du gène *torA* des bactéries du genre *Shewanella* et d'*E. coli*.

Une nouvelle série d'amorces, dénommées « BN », a ainsi été élaborée (Figure 13).

10 Pour l'ensemble des expériences, l'amplification PCR est réalisée avec une température d'hybridation de 55°C. A cette température, une petite partie seulement des amorces présentes dans le mélange va pouvoir s'hybrider de manière spécifique à l'ADN matrice. Pour cette raison, une quantité plus importante d'amorces moléculaires est ajoutée au mélange réactionnel (environ 100 pmoles dans 50 µl final).

15 Les amorces BN obtenues sont les amorces BN1+, BN2-, BN3+, BN4-, BN5-, BN6+ telles que définies ci-dessus.

Le tableau 1 ci-dessous représente les résultats obtenus quant à l'application des amorces moléculaires BN sur l'ADN de différentes bactéries.

L'amplification est réalisée à partir de 5 ng d'ADN chromosomique bactérien. La réaction PCR met en jeu 30 cycles de réactions successives.

20 + : Un fragment d'ADN spécifique à la taille attendue est amplifié

- : Aucune amplification

Tableau 1

Bactéries	Amorces BN1+/BN2-	Amorces BN1+/BN4-	Amorces BN3+/BN5-	Amorces BN6+/BN4-	Amorces BN6+/BN2-
<i>S. massilia</i>	+	+	+	+	+
<i>Shewanella c</i>	+	+	+	+	+
<i>S. putrefaciens</i>	+	+	+	+	+
<i>P. phosphoreum</i>	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	-	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	-	-	+	+	+
<i>R. sphaeroides</i>	-	-	-	+	+

Deux couples d'amorces : BN6+/BN2- et BN6+/BN4-, permettent d'amplifier un fragment d'ADN spécifique chez l'ensemble des bactéries testées, et notamment chez *R. sphaeroides*.

5 Les amorces BN se révèlent donc parfaitement appropriées pour la détection des bactéries qui possèdent un système TMAO réductase, et qui sont susceptibles de contaminer les chairs de poissons.

10 D'autre part, l'utilisation lors de la PCR d'une température d'hybridation élevée (55°C), et d'une quantité plus importante d'amorces moléculaires dégénérées, a permis d'améliorer de façon significative la spécificité de l'amplification.

(3) Amorces moléculaires élaborées à partir du gène codant pour le cytochrome TorC du système TMAO réductase : amorces « BC ».

15 L'étude du système TMAO réductase chez différentes bactéries a permis de montrer que la chaîne de transfert d'électrons jusqu'à l'enzyme terminale TorA fait intervenir dans tous les cas un cytochrome pentahémique de type *c*, le cytochrome TorC (ou DorC) (6, 9, 10, 19).

Afin de mettre en évidence le système TMAO réductase chez les bactéries d'altération, des amorces nucléiques dirigées contre le gène codant pour ce cytochrome ont été élaborées.

20 Le multi-alignement de séquences protéiques, présenté dans la **figure 14**, fait apparaître de nombreuses régions protéiques conservées entre les cytochromes du système TMAO réductase de différentes bactéries : *S. massilia*, *E. coli*, *R. sphaeroides*. Certaines de ces régions conservées correspondent aux sites de fixation des hèmes de type *c* (motif CxxCH) et sont donc retrouvées dans un grand nombre de cytochromes tétrahémiques de classe NapC/NirT impliqués dans d'autres systèmes respiratoires (24). Le cytochrome TorC possède
25 néanmoins la particularité de contenir un domaine carboxy-terminal additionnel qui fixe un cinquième hème (6, 19).

30 Les amorces moléculaires BC sont les amorces BC1+, BC2+, BC2- et BC3- telles que définies ci-dessus. Pour élaborer lesdites amorces, les régions protéiques conservées ont été recherchées parmi l'ensemble des cytochromes de classe NapC/NirT (sondes BC2+ et BC2-), mais aussi uniquement parmi les cytochromes TorC (sondes BC1+ et BC3-). La position et l'orientation des quatre amorces moléculaires dégénérées BC sont indiquées dans la **figure 14**.

Les amorces moléculaires BC sont capables de s'hybrider au gène codant pour le

cytochrome TorC du système TMAO réductase.

La réaction PCR est réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées avec les amorces moléculaires BN. Elle met en jeu 30 cycles de réaction successives. Chaque cycle est constitué d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s, d'une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 s et d'une étape d'élongation pendant 45 s.

Environ 100 pmoles de chaque amorces moléculaires sont ajoutées au mélange réactionnel (volume final 50 µl). Parmi les trois couples d'amorces moléculaires testés (BC1+/BC2-, BC1+/BC3- et BC2+/BC3-), le couple BC1+/BC2- a permis d'amplifier un fragment d'ADN à la taille attendue (177 paires de bases) pour l'ensemble des bactéries précédemment testées (figure 15 ; pistes 1 à 5). Ce résultat nous permet d'envisager l'utilisation du couple d'amorces moléculaires BC1+/BC2- pour le test PCR.

En parallèle, la même expérience PCR a été réalisée avec le couple d'amorces BC1+/BC2- à partir du chromosome de la bactérie *Erwinia chrysanthemi*, entérobactérie phytopathogène qui serait dépourvue d'un système TMAO réductase (4). Dans ce cas, aucun fragment d'ADN d'une taille compatible avec celle attendue pour une amplification à partir du gène *torC* n'est observé (figure 15, piste 6).

Le couple d'amorces BC1+/BC2- semble donc reconnaître spécifiquement le cytochrome TorC du système TMAO réductase.

20 (4) Application de la technique de la PCR aux cellules entières

Pour la réalisation d'un test PCR destiné à être utilisé directement à partir d'échantillons de poissons, il est important de s'affranchir de l'étape de préparation de l'ADN chromosomique des bactéries. Pour cette raison, les expériences de PCR utilisant les couples d'amorces DDN, BN et BC ont été reproduites à partir de bactéries entières de *S. massilia*. Les colonies bactériennes isolées sur boîte sont remises en suspension dans 200 µl d'eau distillée stérile (DO₆₀₀ comprise entre 0,1 et 0,5). La réaction PCR est alors réalisée dans les conditions précédemment décrites avec pour matrice 2,5 µl de la suspension cellulaire (dans 50 µl de volume final). Pour l'ensemble des réactions PCR réalisées (avec les amorces DDN, BN et BC), le résultat obtenu est équivalent à celui observé avec de l'ADN chromosomique purifié.

30 Les bactéries sont donc bien lysées au cours de la première étape de la PCR qui correspond à une incubation à 94°C des échantillons pendant 1,5 min. Ce résultat positif permet d'envisager une utilisation du test PCR directement à partir des chairs de poissons.

II) Application du test PCR-TMAO aux chairs de poissons

Après avoir vérifié la spécificité des amorces moléculaires selon l'invention sur des bactéries responsables de l'altération des produits de la mer, l'étape suivante consiste donc dans
5 l'application directe du test PCR à des chairs de poissons.

Les quatre couples d'amorces DDN1+/DDN5-, BN6+/BN4-, BN6+/BN2- et BC1+/BC2- ont été choisis pour réaliser ces tests car ils permettent l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique pour la grande majorité des bactéries précédemment testées.

10 (1) Influence de l'ADN chromosomique du poisson lors de l'amplification PCR du gène de la TMAO réductase des bactéries.

Pour l'utilisation du test PCR sur des échantillons de chairs de poissons, il faut d'abord vérifier que l'ADN chromosomique du poisson ne rentre pas en compétition avec l'ADN bactérien, lors de l'hybridation des amorces moléculaires.

15 Afin de tester l'influence de l'ADN chromosomique du poisson sur la spécificité des amorces moléculaires selon l'invention, des concentrations variables d'ADN chromosomique purifié de sperme de hareng ont été ajoutées au mélange réactionnel de la PCR contenant ou non 2,5 µl de suspension cellulaire de la bactérie *S. massilia*.

La figure 16 obtenue avec le couple d'amorces DDN1+/DDN5- montre qu'aucun
20 fragment d'ADN n'est amplifié en absence de bactérie ajoutée au mélange réactionnel (piste 1 à 3) et ceci, quelle que soit la concentration d'ADN chromosomique de poisson. Si on ajoute la bactérie *S. massilia* au mélange réactionnel (pistes 4 à 6) un fragment d'ADN spécifique est amplifié. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les couples d'amorces BN6+/BN2-, BN6+/BN4- ou BC1+/BC2-, et permettent ainsi de conclure que la présence d'ADN étranger
25 dans le mélange réactionnel de la PCR n'interfère pas avec la spécificité des amorces moléculaires selon l'invention.

Ces résultats importants permettent donc d'exclure l'éventualité d'une amplification non spécifique qui serait due à l'ADN chromosomique du poisson.

30 (2) Extraction de l'ADN total des chairs de poissons et validation de la technique PCR.

Traditionnellement, les tests de détection des micro-organismes, lors du contrôle

microbiologique des aliments, nécessitent une première étape de pré-enrichissement des bactéries sur un milieu sélectif.

Dans la perspective d'un test rapide de qualité fraîcheur, la technique de la PCR a été appliquée directement à des échantillons de poisson. Différentes conditions d'extraction de l'ADN total des chairs de poissons en voie d'altération (ADN bactérien + ADN du poisson) ont donc été testées.

Dans un premier temps, une technique rapide d'extraction de l'ADN des cellules a été testée en traitant les échantillons de poisson au NaOH/SDS (25). Cette technique permet la lyse cellulaire et donc l'extraction de l'ADN chromosomique total. La préparation se fait à partir d'environ 25 mg de chairs prélevés sur un poisson (rouget de roche) gardé 12 heures à température ambiante. Après 10 min d'incubation à 95°C, 5 µl du mélange de chairs de poisson homogénéisées sont utilisés directement dans le mélange réactionnel de la PCR.

Toutefois, par cette technique rapide d'extraction de l'ADN total, l'ensemble des réactions PCR réalisées avec les différentes amorces moléculaires n'a pas permis d'amplifier un fragment d'ADN spécifique. La présence de plusieurs substances inhibitrices de la PCR contenues dans les chairs de poissons pourrait expliquer ce résultat. En effet, des composés présents en grande quantité dans certains produits alimentaires (graisses, protéines...) peuvent avoir une influence sur l'efficacité de la PCR (26). Afin de vérifier cette hypothèse, les mêmes tests PCR ont été réalisés en rajoutant aux échantillons de chairs de poissons 5 ng d'ADN chromosomique de *S. massilia*. Toutefois, comme précédemment, aucun fragment d'ADN n'a été amplifié par PCR, quelles que soient les amorces moléculaires utilisées.

Ces résultats permettent de conclure que la réaction PCR est inhibée par certains composés contenus dans les chairs de poissons.

La technique de purification de l'ADN chromosomique total des chairs de poissons, utilisée selon la présente invention, doit donc permettre d'éliminer l'ensemble des composés inhibiteurs de la PCR.

Un kit d'extraction rapide de l'ADN (environ 1 heure), basée sur la fixation des acides nucléiques à des billes de silice, a ainsi été testé (kit commercialisé sous la dénomination « High Pure PCR Template Preparation Kit » par Boehringer Mannheim/Roche). Après fixation de l'ADN, cette technique permet en effet d'éliminer les sels, les protéines et d'autres impuretés cellulaires par une simple étape de lavage.

L'extraction de l'ADN total (ADN bactérien + ADN de poisson) a été réalisée sur quatre

espèces de poisson différentes en voie de décomposition (gardés 12 h à température ambiante) : 2 espèces de la mer Méditerranée (rouget de roche et dorade), et 2 espèces de l'Atlantique (sole et cabillaud). A partir d'environ 50 mg de chairs de ces poissons (prélevés sous la peau), 1 à 4 µg d'ADN chromosomique total ont ainsi été purifiés. Environ 25 ng de cet ADN sont alors
 5 ajoutés au mélange réactionnel de la PCR (volume final 50 µl). Pour l'ensemble des réactions PCR, la température d'hybridation est portée à 55°C, et 100 pmoles de chaque amorces moléculaires sont ajoutées au mélange réactionnel.

La figure 17 regroupe les résultats obtenus en utilisant les couples d'amorces DDN1+/DDN5-, BN6+/BN2- et BN6+/BN4-. Pour l'ensemble des espèces de poissons testées,
 10 un fragment d'ADN unique est amplifié, et ceci avec chacun des couples d'amorces utilisés.

La taille du fragment d'ADN amplifié correspond à la taille attendue pour une amplification à partir du gène *torA*. Ce résultat indique que les différents fragments d'ADN ont bien été amplifiés à partir du gène *torA* des bactéries présentes sur les chairs de poisson.

Ainsi, l'utilisation des couples d'amorces moléculaires DDN1+/DDN5-, BN6+/BN2- et
 15 BN6+/BN4- peut être envisagée pour l'application du test PCR à des chairs de poissons.

De plus, l'utilisation d'un filtre de billes de silice est une méthode adéquate pour purifier l'ADN total contenu dans les chairs de poissons. Cette technique est très rapide (environ une heure), et très facile à mettre en œuvre comparativement à une extraction isoamylalcool/chloroforme qui nécessite plusieurs étapes pour éliminer les protéines contenues
 20 dans les chairs de poissons (28).

L'amplification réalisée dans les mêmes conditions avec le couple d'amorces BC1+/BC2- a également donné des résultats encourageants sur l'ADN total de chairs d'un rouget de roche en voie de putréfaction (figure 18). En effet, malgré un bruit de fond important, l'électrophorèse en gel d'agarose des produits de la PCR révèle la présence du fragment de 177
 25 paires de bases.

III) Conclusion

Les couples d'amorces moléculaires selon l'invention permettent donc de détecter le gène *torA* chez les bactéries marines, mais également chez des bactéries relativement éloignées phylogénétiquement, à savoir les entérobactéries et les bactéries des eaux saumâtres.
 30

L'application du test PCR aux chairs de poissons donne des résultats encourageants puisque les amorces moléculaires selon l'invention permettent de détecter le gène *torA* de bactéries présentes sur le poisson en voie de putréfaction. L'amplification PCR ne pouvant être

appliquée directement à des échantillons de chairs de poissons, une extraction de l'ADN total de ces chairs est au préalable nécessaire.

B) MATÉRIELS ET MÉTHODES

5

1) Isolement des souches bactériennes, milieux et conditions de croissance

Le poisson utilisé pour l'isolement des souches bactériennes *Shewanella c* et *Shewanella massilia* correspond à un rouget de roche (*Mullus surmuletus*) pêché en mer Méditerranée au large de Marseille, et gardé à température ambiante pendant 48 heures dans un tube stérile contenant de l'eau de mer. L'eau de mer a été préalablement stérilisée à travers un filtre millipore (0,45µM).

Les souches *Shewanella* sont cultivées en anaérobiose ou en aérobiose à 30°C dans du milieu LB (« Luria Broth » : extrait de levure 10 g/l, bacto-peptone 5g/l et NaCl 5g/l). Les bactéries *E. coli* et *Salmonella typhimurium* sont cultivées à 37°C sur milieu LB. La souche *Photobacterium phosphoreum* a été obtenue par l'ATCC (n°11040) et ne pousse pas sur les milieux conventionnels tel que le milieu LB. Elle est cultivée à 15°C sur milieu marin (marine broth ; Difco).

2) Techniques de PCR

20

a) PCR standards

Les amplifications PCR standards sont réalisées dans les conditions décrites dans la référence (6). Le mélange réactionnel (50 µl) contient 10 ng d'ADN chromosomique, 0,2 µg de chacune des sondes oligonucléotidiques, 100 µM de chacun des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dXTPs), 10 mM de Tris/HCl (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 0,01 % de gélatine et une unité d'ADN polymérase (Taq polymérase, Boehringer Mannheim/Roche). Le mélange réactionnel est finalement recouvert par 50 µl d'huile minérale afin d'empêcher l'évaporation durant le processus de la PCR.

25

L'amplification, réalisée dans un appareil thermocycleur (MJ Research), met en jeu 30 cycles de réactions, un cycle comprenant une étape de dénaturation à 94° C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 72 °C pendant environ 45 secondes (1kb/min). L'ADN est préalablement dénaturé durant 1,5 min à 94°C avant d'entamer le premier cycle. 10 µl de chacun des produits d'amplification sont

30

ensuite analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose.

b) Conditions PCR avec les amorces moléculaires dégénérées selon l'invention

Les amorces moléculaires selon l'invention, notamment les amorces dénommées
5 « DDN », « BN » ou « BC », sont telles que définies ci-dessus.

Le mélange réactionnel (50 µl) contient soit 10 ng d'ADN chromosomique de la
bactérie, soit 5 µl de suspension cellulaire ($DO_{600} = 0,5-1$) soit 25 ng d'ADN total extrait à
partir de poisson, 100 µM de chacun des quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dXTPs),
0,8 µg de chacun des mélanges d'amorces selon l'invention, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM
10 $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,01 % de gélatine et une unité de Taq polymérase.

La réaction PCR met en jeu 30 cycles de réactions successives constituées d'une étape de
dénaturation à 94° C pendant 30 secondes suivie d'une étape d'hybridation à 55°C ou 45°C
pendant 30 secondes, puis d'une étape d'élongation à 72 °C pendant 45 secondes. L'ADN est
préalablement dénaturé durant 1,5 min à 94°C avant d'entamer le premier cycle.

15

3) Préparation d'ADN chromosomique des bactéries

La préparation d'ADN chromosomique des bactéries est réalisée à partir de 10 ml de
culture ($DO_{600} > 1$). Après centrifugation des cellules à 10 000 rpm pendant 10 min, le culot est
resuspendu dans 1 ml d'EDTA 10 mM (pH 8). La lyse des cellules est obtenue par addition de
20 SDS (0,5 % final). Cette solution est mélangée à un volume égal d'isoamylalcool/chloroforme
(1:24). Après centrifugation pendant 20 min à 7 000 rpm, la phase supérieure est récupérée.
Cette opération est reproduite plusieurs fois afin d'éliminer la plus grande quantité de protéines
résiduelles. L'ADN est finalement précipité par ajout de NaCl (0,3 M final) et d'éthanol (2,2
Vol).

25

4) Préparation de l'ADN chromosomique totale des chairs de poissons en voie de putréfaction pour la PCR

**a) Préparation rapide à l'aide d'un kit basé sur la fixation de l'ADN à des billes de
silice (High pure PCR template Preparation Kit, Boehringer Mannheim/Roche)**

30 25 mg de chairs de poissons sont incubés 45 min à 55°C dans 200 µl de tampon de lyse
(urée 4 M, Tris 200 mM, NaCl 20 mM et EDTA 200 mM, pH 7,4) en présence de 40 µl de
protéinase K (0,8 mg). Afin de faciliter la lyse cellulaire, l'échantillon est préalablement broyé

à l'aide d'un scalpel. 200 µl de tampon de fixation (guanidine-HCl 6 M, urée 10 mM, Tris-HCl 10 mM et Triton 20% v/v, pH 4,4) sont ajoutés à l'échantillon qui est ensuite incubé pendant 10 min à 72°C. Cette solution est mélangée à 100 µl d'isopropanol puis centrifugée à 8 000 rpm pendant 1 min à travers un filtre à base de billes de silice (tube High Pure Filter + tube collecteur). Les impuretés résiduelles sont éliminées par deux étapes de lavage (tampon de lavage : NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM, éthanol 80% v/v, pH 7,5). L'ADN est ensuite élué dans un tampon d'élution (Tris 10 mM, pH 8,5).

b) Extraction d'ADN des cellules par traitement au NaOH/SDS

25 mg de chairs de poissons sont prélevés sur un poisson en voie de putréfaction (après 16 heures d'incubation dans un tube stérile gardé à température ambiante), et placés dans 50 µl d'une solution de NaOH 0,05 M, SDS 0,25%. Après broyage des cellules, l'échantillon est incubé 15 min à 95 °C. 450 µl d'eau stérile sont ajoutés au mélange et les débris cellulaires sont alors éliminés par une étape de centrifugation de 2 min à 8 000 g. 5 µl du surnageant obtenu sont directement utilisés pour le test PCR.

c) Extraction isoamylalcool/chloroforme

La préparation d'ADN chromosomique totale par extraction isoamylalcool/chloroforme est réalisée à partir de 25 mg de chairs de poissons contaminées comme décrit précédemment pour l'ADN bactérien. Le nombre d'étapes d'extraction est en revanche augmenté afin de pouvoir éliminer les quantités importantes d'impuretés contenues dans les échantillons de chairs de poissons.

Références bibliographiques

- (1) Unemoto T., Hayashi M. and Miyaki K. (1965) Intracellular localization and properties of trimethylamine *N*-oxide reductase in *Vibrio parahaemolyticus*.
5 *Biochim.Biophys.Acta* 110, 319-328.
- (2) Easter M.C., Gibson D.M. and Ward F.B. (1983) The induction and location of trimethylamine *N*-oxide reductase in *Alteromonas* sp. NCMB 400. *J.Gen.Microbiol.* 129, 3689-3696.
- (3) McEwan A.G., Ferguson S.J. and Jackson J.B. (1983) Electron flow to
10 dimethylsulphoxide or trimethylamine *N*-oxide generates a membrane potential in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch.Microbiol.* 136, 300-305.
- (4) Barrett E.L. and Kwan H.S. (1985) Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annu.Rev.Microbiol.* 39, 131-149.
- (5) Silvestro A., Pommier J. and Giordano G. (1988) The inducible trimethylamine *N*-
15 oxide reductase of *Escherichia coli* K12: biochemical and immunological studies. *Biochim.Biophys.Acta* 954, 1-13.
- (6) Méjean V., Iobbi-Nivol C., Lepelletier M., Giordano G., Chippaux M. and Pascal M.C. (1994) TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the *tor* operon. *Mol.Microbiol.* 11, 1169-1179.
- (7) Yamamoto I., Wada N., Ujiiye T., Tachibana M., Matsuzaki M., Kajiwara H.,
20 Watanabe Y., Hirano H., Okubo A. and Satoh T. (1995) Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 59, 1850-1855.
- (8) Knablein J., Mann K., Ehlert S., Fonstein M., Huber R. and Schneider F. (1996)
25 Isolation, cloning, sequence analysis and localization of the operon encoding dimethyl sulfoxide/trimethylamine *N*-oxide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Biol.* 263, 40-52.
- (9) Ujiiye T., Yamamoto I., Nakama H., Okubo A., Yamazaki S. and Satoh T. (1996)
30 Nucleotide sequence of the genes, encoding the pentaheme cytochrome (*dmsC*) and the transmembrane protein (*dmsB*), involved in dimethyl sulfoxide respiration from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Biochim.Biophys.Acta* 1277, 1-5.

- (10) Mouncey N.J., Choudhary M. and Kaplan S. (1997) Characterization of genes encoding dimethyl sulfoxide reductase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T: an essential metabolic gene function encoded on chromosome II. *J.Bacteriol.* **179**, 7617-7624.
- 5 (11) Malle P. (1994) Microflores bactériennes des poissons marins et évaluation de l'altération. *Rec.Méd.Vét.* **170**, 147-157.
- (12) Gram L. and Huss H.H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int.J.Food Microbiol.* **33**, 121-137.
- (13) Dalgaard P., Gram L. and Huss H.H. (1993) Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int.J.Food Microbiol.* **19**, 283-294.
- 10 (14) Malle P. and Poumeyrol M. (1989) A new chemical criterion for the quality control of fish: Trimethylamine/Total Volatile Basic Nitrogen (%). *J.Food Prot.* **52**, 419-423.
- (15) Large P.J. and MacDougall H. (1975) An enzymatic method for the microestimation of trimethylamine. *Anal.Biochem.* **64**, 304-310.
- (16) Ritskes T.M. (1975) Gas chromatographic determination of trimethylamine and dimethylamine in fish, fishery products, and other foods. *J.Food Technol.* **10**, 221-228.
- 15 (17) Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White T.J. (1990) *PCR Protocols*. Academic Press, Inc., San Diego.
- (18) Lee H., Morse S. and Olsvik O. (1997) *Nucleic Acid Amplification Technologies: Application to Disease Diagnosis*. Eaton Publishing, Boston.
- 20 (19) Dos Santos J.P., Iobbi-Nivol C., Couillault C., Giordano G. and Méjean V. (1998) Molecular analysis of the trimethylamine *N*-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *J. Mol. Biol.* **284**, 421-433.
- (20) Czjzek M., Dos Santos J.P., Pommier J., Giordano G., Méjean V. and Haser R. (1998) Crystal structure of oxidized trimethylamine *N*-oxide reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **284**, 434-447.
- 25 (21) Dalgaard P. (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int.J.Food Microbiol.* **26**, 319-333.
- (22) Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- 30 (23) Jourlin C., Simon G., Lepelletier M., Chippaux M. and Méjean V. (1995). Conservation of cis-acting elements within the *tor* regulatory region among different Enterobacteriaceae. *Gene*, **152**, 53-57.

- (24) Roldan M.D., Sears H.J., Cheesman M.R., Ferguson S.J., Thomson A.J., Berks B.C. and Richardson D.J. (1998). Spectroscopic characterization of a novel multiheme c-type cytochrome widely implicated in bacterial electron transport. *J. Biol. Chem.* 273, 28785-28790.
- 5 (25) Rossen L., Holmstrom K., Olsen J.E. and Rasmussen O.F. (1991) A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Int.J.Food Microbiol.* 14, 145-151.
- (26) Rossen L., Norskov P., Holmstrom K. and Rasmussen O.F. (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int.J.Food Microbiol.* 17, 37-45.
- 10 (27) Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- (28) Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 15 (29) Takagi M., Tsuchiya T. and Ishimoto M. (1981) Proton translocation coupled to trimethylamine N-oxide reduction in anaerobically grown *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 148, 762-768.
- (30) Pommier J., Méjean V., Giordano G. and Iobbi-Nivol C. (1998) TorD, a cytoplasmic chaperone that interacts with the unfolded trimethylamine N-oxide reductase enzyme (TorA) in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 273, 16615-16620.
- 20 (31) Graham A., Boxer D.H., Haddock B.A., Mandrand-Berthelot A.M. and Jones R.W. (1980) Immunochemical analysis of the membrane-bound hydrogenase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 113, 167-172.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de séquences nucléotidiques choisies parmi celles comprenant une séquence codant pour une protéine du système triméthylamine N-oxyde réductase (TMAO réductase) chez les bactéries, ou un fragment de cette séquence telle qu'une sonde ou une amorce d'environ 15 à environ 25 nucléotides, ou une séquence dérivée par addition, suppression, et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides de cette séquence codant pour une protéine du système TMAO réductase ou d'un fragment de cette dernière, ledit fragment et ladite séquence dérivée étant capables de s'hybrider avec ladite séquence codant pour une protéine du système TMAO réductase, pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection de la présence de toutes bactéries impliquées dans le processus de dégradation des chairs d'animaux aquatiques, chez un hôte susceptible d'être porteur de telles bactéries.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence codant pour une protéine du système TMAO réductase est choisie parmi les séquences codant pour la TMAO réductase chez les bactéries, encore désignée protéine TorA ou DorA, ou codant pour un cytochrome de type *c*, encore désigné protéine TorC ou DorC.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que les séquences nucléotidiques codant pour une protéine du système TMAO réductase sont choisies parmi celles des bactéries suivantes :

- les bactéries marines, telles que celles du genre *Shewanella*, *Photobacterium* ou *Vibrio*, lesdites séquences étant notamment choisies parmi les suivantes :

- * la séquence codant pour la protéine TorA de *Shewanella massilia* représentée sur la figure 1,
- * la séquence codant pour la protéine TorA de *Shewanella putrefaciens* représentée sur la figure 1,
- * la séquence codant pour la protéine TorA de *Shewanella c* représentée sur la figure 2,
- * la séquence partielle codant pour la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum* représentée sur la figure 3,
- * la séquence codant pour la protéine TorC de *Shewanella massilia* représentée sur la figure 14,

- les bactéries provenant des eaux saumâtres, telles que celles du genre *Rhodobacter*, ou *Roseobacter*, lesdites séquences étant notamment choisies parmi les suivantes :

* la séquence codant pour la protéine DorA de *Rhodobacter sphaeroides* représentée sur la figure 4,

5 * la séquence codant pour la protéine DorA de *Rhodobacter capsulatus* représentée sur la figure 4,

* la séquence codant pour la protéine DorC de *Rhodobacter sphaeroides* représentée sur la figure 14,

10 - les entérobactéries, telles que celles du genre *Escherichia*, ou *Salmonella*, lesdites séquences étant notamment choisies parmi les suivantes :

* la séquence codant pour la protéine TorA de *Escherichia coli* représentée sur la figure 4,

* la séquence partielle codant pour la protéine TorA de *Salmonella typhimurium* représentée sur la figure 5,

15 * la séquence codant pour la protéine TorC de *Escherichia coli* représentée sur la figure 14.

20 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que les séquences nucléotidiques sont utilisées sous forme de couples d'amorces choisis parmi l'un quelconque des trois groupes d'amorces suivants :

(1) le groupe d'amorces « DDN » comprenant :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN+ » suivantes :

- DDN1+ : 5' CGG vGA yTA CTC bAC hGG TGC 3' : mélange de 54 séquences nucléotidiques,

25 - DDN5+ : 5' ATy GAT GCG ATy CTC GAA CC 3' : mélange de 4 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN- » suivantes :

- DDN2- : 5' CGT Amw sGT CGA kAT CGT TrC GCT C 3' : mélange de 32 séquences nucléotidiques,

30 - DDN3- : 5' GAC TCA CAy Awy TGy GAG TG 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,

- DDN4- : 5' TGr CCd CGr kCG TTA AAG AC 3' : mélange de 24 séquences nucléotidiques,

- DDN5- : 5' CCv GGT TCG AGr ATC GCA TC 3' : mélange de 6 séquences nucléotidiques,

5 (2) le groupe d'amorces « BN » comprenant :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN+ » suivantes :

- BN1+ : 5' C bGA yAT CsT rCT GCC 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,

- BN3+ : 5' GGm GAY TAY TCb ACm GGy GC 3' : mélange de 96 séquences

nucléotidiques,

10 - BN6+ : 5' Twy GAr CGy AAC GAY mTC GA 3' : mélange de 64 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN- » suivantes :

- BN2- : 5' GG vyC rTA CCA bsC vCC TTC 3' : mélange de 216 séquences

nucléotidiques,

15 - BN4- : 5' ATC Arr CCn swv GGC GTG CC 3' : mélange de 192 séquences nucléotidiques,

- BN5- : 5' GbC ACr TCd GTy TGy GG 3' : mélange de 72 séquences nucléotidiques,

(3) le groupe d'amorces « BC » comprenant :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC+ » suivantes :

20 - BC1+ : 5' ACn CCn GAr AAr TTy GAr GC 3' : mélange de 256 séquences nucléotidiques,

- BC2+ : 5' TGy ATy GAY TGy CAY AAr GG 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC- » suivantes :

25 - BC2- : 5' CCy TTr TGr CAr TCd ATr CA 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

- BC3- : 5' TTn GCr TCr AAr TGn GC 3' : mélange de 128 séquences nucléotidiques,

dans lesquelles n = (A,C,G,T), y = (C,T), r = (A,G), h = (A,C,T), d = (G,A,T), m = (A,C), w = (A,T), b = (G,T,C), s = (G,C), v = (G,A,C), et k = (G, T),

les couples d'amorces étant choisis de telle sorte que l'une des amorces d'un couple correspond à l'une des compositions de séquences nucléotidiques DDN+, BN+ ou BC+ susmentionnées, tandis que l'autre amorce correspond respectivement à l'une des compositions de séquences nucléotidiques DDN-, BN- ou BC- susmentionnées, lesdits couples d'amorces

étant notamment choisis parmi l'un quelconque des quatre couples suivants :

(a) le couple DDN1+ / DDN5-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 820 paires de bases (bp), et notamment à l'amplification d'un fragment de 821 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 821 bp délimité par les nucléotides situés aux positions 620 à 1450 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

(b) le couple BN6+ / BN2-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 710 bp, et notamment à l'amplification d'un fragment de 727 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 727 bp délimité par les nucléotides situés aux positions 1657 à 2403 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

(c) le couple BN6+ /BN4-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 360 bp, et notamment à l'amplification d'un fragment de 355 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 355 bp délimité par les nucléotides situés aux positions 1657 à 2023 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

(d) le couple BC1+ /BC2-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorC chez les bactéries, d'une taille d'environ 170 bp, et notamment à l'amplification d'un fragment de 197 bp du gène codant pour la protéine TorC chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 197 bp codant pour le fragment polypeptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 114 à 179 de la protéine TorC de *S. massilia* représentée sur la figure 14.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les hôtes susceptibles d'être porteurs de bactéries impliquées dans le processus de dégradation des chairs d'animaux aquatiques, telles que décrites dans la revendication 3, sont des organismes aquatiques, notamment des organismes marins tels que les poissons et les crustacés, et plus particulièrement les poissons d'Atlantique tels que la sole, le cabillaud, ou les poissons de la mer Méditerranée tels que le rouget de roche, la dorade, ainsi que certains animaux des eaux douces ou saumâtres.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection de la présence de toutes bactéries impliquées dans la dégradation des chairs d'animaux aquatiques, dans le cadre d'un procédé d'évaluation de l'état de fraîcheur des animaux aquatiques sur lesquels est prélevé l'échantillon testé, lorsque ces derniers sont extraits de leur environnement naturel.

7. Séquence nucléotidique correspondant à l'une des séquences suivantes :

- DDN1+ : 5' CGG vGA yTA CTC bAC hGG TGC 3',
- DDN5+ : 5' ATy GAT GCG ATy CTC GAA CC 3',
- 10 - DDN2- : 5' CGT Amw sGT CGA kAT CGT TrC GCT C 3',
- DDN3- : 5' GAC TCA CAy Awy TGy GAG TG 3',
- DDN4- : 5' TGr CCd CGr kCG TTA AAG AC 3',
- DDN5- : 5' CCv GGT TCG AGr ATC GCA TC 3',
- BN1+ : 5' C bGA yAT CsT rCT GCC 3',
- 15 - BN3+ : 5' GGm GAy TAy TCb ACm GGy GC 3',
- BN6+ : 5' Twy GAr CGy AAC GAy mTC GA 3',
- BN2- : 5' GG vyC rTA CCA bsC vCC TTC 3',
- BN4- : 5' ATC Arr CCn swv GGC GTG CC 3',
- BN5- : 5' GbC ACr TCd GTy TGy GG 3',
- 20 - BC1+ : 5' ACn CCn GAr AAr TTy GAr GC 3',
- BC2+ : 5' TGy ATh GAy TGy CAy AAr GG 3',
- BC2- : 5' CCy TTr TGr CAr TCd ATr CA 3',
- BC3- : 5' TTn GCr TCr AAr TGn GC 3',

dans lesquelles n = (A,C,G,T), y = (C,T), r = (A,G), h = (A,C,T), d = (G,A,T), m = (A,C),

25 w = (A,T), b = (G,T,C), s = (G,C), v = (G,A,C), et k = (G,T).

8. Composition de séquences nucléotidiques en mélange, correspondant à l'une des compositions suivantes :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN+ » suivantes :

- 30 - DDN1+ : 5' CGG vGA yTA CTC bAC hGG TGC 3' : mélange de 54 séquences nucléotidiques,

- DDN5+ : 5' ATy GAT GCG ATy CTC GAA CC 3' : mélange de 4 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN- » suivantes :

5 - DDN2- : 5' CGT Amw sGT CGA kAT CGT TrC GCT C 3' : mélange de 32 séquences nucléotidiques,

- DDN3- : 5' GAC TCA CAy Awy TGy GAG TG 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,

- DDN4- : 5' TGr CCd CGr kCG TTA AAG AC 3' : mélange de 24 séquences nucléotidiques,

10 - DDN5- : 5' CCv GGT TCG AGr ATC GCA TC 3' : mélange de 6 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN+ » suivantes :

- BN1+ : 5' C bGA yAT CsT rCT GCC 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,

15 - BN3+ : 5' GGm GAY TAY TCb ACm GGy GC 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

- BN6+ : 5' Twy GAr CGy AAC GAY mTC GA 3' : mélange de 64 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN- » suivantes :

20 - BN2- : 5' GG vyC rTA CCA bsC vCC TTC 3' : mélange de 216 séquences nucléotidiques,

- BN4- : 5' ATC Arr CCn swv GGC GTG CC 3' : mélange de 192 séquences nucléotidiques,

- BN5- : 5' GbC ACr TCd GTy TGy GG 3' : mélange de 72 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC+ » suivantes :

25 - BC1+ : 5' ACn CCn GAr AAr TTy GAr GC 3' : mélange de 256 séquences nucléotidiques,

- BC2+ : 5' TGy ATh GAY TGy CAy AAr GG 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC- » suivantes :

30 - BC2- : 5' CCy TTr TGr CAr TCd ATr CA 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

- BC3- : 5' TTn GCr TCr AAr TGn GC 3' : mélange de 128 séquences nucléotidiques,

dans lesquelles $n = (A, C, G, T)$, $y = (C, T)$, $r = (A, G)$, $h = (A, C, T)$, $d = (G, A, T)$, $m = (A, C)$, $w = (A, T)$, $b = (G, T, C)$, $s = (G, C)$, $v = (G, A, C)$, et $k = (G, T)$.

9. Couple d'amorces caractérisé en ce qu'il est choisi au sein de l'un des groupes
- 5 d'amorces suivants :
- (1) le groupe d'amorces « DDN » comprenant :
- ♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN+ » suivantes :
 - DDN1+ : 5' CGG vGA yTA CTC bAC hGG TGC 3' : mélange de 54 séquences nucléotidiques,
 - 10 - DDN5+ : 5' ATy GAT GCG ATy CTC GAA CC 3' : mélange de 4 séquences nucléotidiques,
 - ♦ les compositions de séquences nucléotidiques « DDN- » suivantes :
 - DDN2- : 5' CGT Amw sGT CGA kAT CGT TrC GCT C 3' : mélange de 32 séquences nucléotidiques,
 - 15 - DDN3- : 5' GAC TCA CAy Awy TGy GAG TG 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,
 - DDN4- : 5' TGr CCd CGr kCG TTA AAG AC 3' : mélange de 24 séquences nucléotidiques,
 - DDN5- : 5' CCv GGT TCG AGr ATC GCA TC 3' : mélange de 6 séquences nucléotidiques,
 - 20 - DDN6- : 5' CCv GGT TCG AGr ATC GCA TC 3' : mélange de 6 séquences nucléotidiques,
- (2) le groupe d'amorces « BN » comprenant :
- ♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN+ » suivantes :
 - BN1+ : 5' C bGA yAT CsT rCT GCC 3' : mélange de 16 séquences nucléotidiques,
 - BN3+ : 5' GGm GAY TAY TCb ACm GGy GC 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,
 - 25 - BN6+ : 5' Twy GAr CGy AAC GAY mTC GA 3' : mélange de 64 séquences nucléotidiques,
 - ♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BN- » suivantes :
 - BN2- : 5' GG vyC rTA CCA bsC vCC TTC 3' : mélange de 216 séquences nucléotidiques,
 - 30 - BN4- : 5' ATC Arr CCn swv GGC GTG CC 3' : mélange de 192 séquences nucléotidiques,

- BN5- : 5'GbC ACr TCd GTy TGy GG 3' : mélange de 72 séquences nucléotidiques,
(3) le groupe d'amorces « BC » comprenant :

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC+ » suivantes :

- BC1+ : 5' ACn CCn GAr AAr TTy GAr GC 3' : mélange de 256 séquences
5 nucléotidiques,

- BC2+ : 5' TGy ATh GAY TGy CAy AAr GG 3' : mélange de 96 séquences
nucléotidiques,

♦ les compositions de séquences nucléotidiques « BC- » suivantes :

- BC2- : 5' CCy TTr TGr CAr TCd ATr CA 3' : mélange de 96 séquences nucléotidiques,

10 - BC3- : 5' TTn GCr TCr AAr TGn GC 3' : mélange de 128 séquences nucléotidiques,
dans lesquelles n = (A,C,G,T), y = (C,T), r = (A,G), h = (A,C,T), d = (G,A,T), m = (A,C),
w = (A,T), b = (G,T,C), s = (G,C), v = (G,A,C), et k = (G,T),

les couples d'amorces étant choisis de telles de telle sorte que l'une des amorces d'un
couple correspond à l'une des compositions de séquences nucléotidiques DDN+, BN+ ou BC+
15 susmentionnées, tandis que l'autre amorce correspond respectivement à l'une des compositions
de séquences nucléotidiques DDN-, BN- ou BC- susmentionnées, lesdits couples d'amorces
étant notamment choisis parmi l'un quelconque des quatre couples suivants :

(a) le couple DDN1+ / DDN5-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant
pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 820 paires de bases (bp), et
20 notamment à l'amplification d'un fragment de 821 bp du gène codant pour la protéine TorA
chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 821 bp délimité par les
nucléotides situés aux positions 620 à 1450 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure
4,

(b) le couple BN6+ / BN2-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant
25 pour la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 710 bp, et notamment à
l'amplification d'un fragment de 727 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries
du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 727 bp délimité par les nucléotides situés aux
positions 1657 à 2403 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

(c) le couple BN6+ /BN4-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour
30 la protéine TorA chez les bactéries, d'une taille d'environ 360 bp, et notamment à
l'amplification d'un fragment de 355 bp du gène codant pour la protéine TorA chez les bactéries
du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 355 bp délimité par les nucléotides situés aux

positions 1657 à 2023 du gène *torA* de *S. massilia* représenté sur la figure 4,

- (d) le couple BC1+ /BC2-, conduisant à l'amplification de fragments du gène codant pour la protéine TorC chez les bactéries, d'une taille d'environ 170 bp, et notamment à l'amplification d'un fragment de 197 bp du gène codant pour la protéine TorC chez les bactéries du genre *Shewanella*, tel que le fragment de 197 bp codant pour le fragment polypeptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 114 à 179 de la protéine TorC de *S. massilia* représentée sur la figure 14.

- 10 10. Méthode de détection de toutes bactéries impliquées dans la dégradation des chairs d'animaux aquatiques chez un hôte susceptible d'être porteur de telles bactéries, ladite méthode étant effectuée à partir d'un échantillon biologique prélevé sur cet hôte, cet échantillon biologique correspondant notamment à un fragment sous-cutané de chair de l'animal aquatique en question, et étant caractérisée en ce qu'elle comprend une étape d'hybridation d'au moins une séquence nucléotidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 9, avec des fragments des gènes codant pour une protéine du système TMAO-réductase de 15 bactéries impliquées dans la dégradation des chairs d'animaux aquatiques susceptibles d'être présentes dans l'échantillon biologique prélevé sur ledit hôte, suivie d'une étape de révélation, notamment par électrophorèse, de la présence éventuelle dans ledit échantillon de gènes codant pour une protéine du système TMAO-réductase, ou de fragments de ces gènes, dont le nombre 20 de copies a été le cas échéant amplifié.

11. Méthode de détection selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- le traitement d'un échantillon biologique prélevé sur cet hôte afin d'extraire l'ADN total de cet hôte et de rendre le génome de ces bactéries accessible aux séquences nucléotidiques ou amorces définies selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, ce traitement étant notamment effectué à l'aide d'une technique d'extraction rapide de l'ADN basée sur la fixation des acides nucléiques à des billes de silice,
- l'amplification du nombre de copies de gènes codant pour les protéines du système TMAO-réductase de bactéries impliquées dans la dégradation des chairs d'animaux aquatiques, ou de fragments de ces gènes, susceptibles d'être présents dans cet échantillon, à l'aide des séquences nucléotidiques ou amorces susmentionnées hybridant avec les gènes ou fragments de

gènes susmentionnés,

- la détection de la présence éventuelle d'un nombre amplifié de copies de gènes codant pour une protéine du système TMAO-réductase des bactéries susmentionnées, ou de fragments de ces gènes, et donc de la présence de telles bactéries dans l'échantillon biologique étudié.

5

12. Méthode de détection selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'amplification du nombre de gènes codant pour la TMAO-réductase comprend les étapes suivantes :

- la prédénaturation de l'ADN double brin total de l'hôte en ADN mono-brin, de préférence dans un tampon constitué de 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂,
10 0,01 % de gélatine, des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) à une concentration de 100 µM chacun, et des couples d'amorces, tels que définis dans les revendications 1 à 9, par chauffage entre environ 90 °C et environ 100 °C, avantageusement à 94 °C, pendant environ 1,5 minute,

- l'amplification proprement dite par addition au milieu obtenu à l'étape précédente
15 d'ADN polymérase, par exemple la Taq polymérase,

♦ chauffage à environ 94°C pendant environ 30 secondes, ce qui correspond à l'étape de dénaturation proprement dite,

♦ puis chauffage entre environ 35°C à environ 60 °C, et notamment à environ 45°C
20 ou 55°C, pendant environ 30 secondes, ce qui correspond à l'étape d'hybridation des amorces avec les gènes codant pour les protéines du système TMAO-réductase de bactéries, ou des fragments de ces gènes, susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique étudié,

♦ et enfin, chauffage à 72 °C, pendant environ 45 secondes, ce qui correspond à
25 l'étape d'élongation des amorces, hybridées à l'étape précédente, l'une vers l'autre, produisant ainsi des séquences nucléotidiques complémentaires de fragments de gènes codant pour les protéines du système TMAO-réductase de bactéries, ces dernières séquences étant délimitées par les nucléotides s'hybridant avec les amorces susmentionnées,

- la répétition de l'étape d'amplification précédente entre environ 15 et environ 35 fois, avantageusement environ 30 fois.

30 13. Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une ou plusieurs séquences nucléotidiques ou amorces définies dans l'une des

revendications 1 à 9,

- une ADN polymérase,

- un milieu réactionnel avantageusement constitué de 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,01 % de gélatine, des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP,

5 dATP, dGTP, dTTP) à une concentration de 100 µM chacun.

13. Séquence nucléotidique comprenant :

- la séquence représentée sur la figure 2 du gène torA codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Shewanella C*,

10 * ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour la protéine TorA de *Shewanella C*, dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 6,

15 * ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 2,

* ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides,

20 - la séquence partielle représentée sur la figure 3 du gène codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Photobacterium phosphoreum*,

* ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum* dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 7,

25 * ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 3,

30 * ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides,

- la séquence partielle représentée sur la figure 5 du gène codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Salmonella typhimurium*,

* ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour la protéine TorA de *Salmonella typhimurium* dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 8,

* ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 5,

* ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides.

16. Séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique selon la revendication 15, et comprenant :

- la séquence en acides aminés représentée sur la figure 6 de la protéine TorA de *Shewanella C*,

* ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 6,

* ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 5 acides aminés,

- la séquence partielle en acides aminés représentée sur la figure 7 de la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum*,

* ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 7,

* ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au

moins environ 5 acides aminés,

- la séquence partielle en acides aminés représentée sur la figure 8 de la protéine TorA de

Salmonella typhimurium,

5 * ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 8,

10 * ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 5 acides aminés.

gènes susmentionnés,

- la détection de la présence éventuelle d'un nombre amplifié de copies de gènes codant pour une protéine du système TMAO-réductase des bactéries susmentionnées, ou de fragments de ces gènes, et donc de la présence de telles bactéries dans l'échantillon biologique étudié.

5

12. Méthode de détection selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'amplification du nombre de gènes codant pour la TMAO-réductase comprend les étapes suivantes :

- la prédénaturation de l'ADN double brin total de l'hôte en ADN mono-brin, de préférence dans un tampon constitué de 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,01 % de gélatine, des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) à une concentration de 100 µM chacun, et des couples d'amorces, tels que définis dans les revendications 1 à 9, par chauffage entre environ 90 °C et environ 100 °C, avantageusement à 94 °C, pendant environ 1,5 minute,

10

- l'amplification proprement dite par addition au milieu obtenu à l'étape précédente d'ADN polymérase, par exemple la Taq polymérase,

15

♦ chauffage à environ 94°C pendant environ 30 secondes, ce qui correspond à l'étape de dénaturation proprement dite,

♦ puis chauffage entre environ 35°C à environ 60 °C, et notamment à environ 45°C ou 55°C, pendant environ 30 secondes, ce qui correspond à l'étape d'hybridation des amorces avec les gènes codant pour les protéines du système TMAO-réductase de bactéries, ou des fragments de ces gènes, susceptibles d'être présents dans l'échantillon biologique étudié,

20

♦ et enfin, chauffage à 72 °C, pendant environ 45 secondes, ce qui correspond à l'étape d'élongation des amorces, hybridées à l'étape précédente, l'une vers l'autre, produisant ainsi des séquences nucléotidiques complémentaires de fragments de gènes codant pour les protéines du système TMAO-réductase de bactéries, ces dernières séquences étant délimitées par les nucléotides s'hybridant avec les amorces susmentionnées,

25

- la répétition de l'étape d'amplification précédente entre environ 15 et environ 35 fois, avantageusement environ 30 fois.

30

13. Kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une ou plusieurs séquences nucléotidiques ou amorces définies dans l'une des

revendications 1 à 9,

- une ADN polymérase,

- un milieu réactionnel avantageusement constitué de 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,01 % de gélatine, des 4 désoxynucléotides constitutifs des ADN (dCTP,

5 dATP, dGTP, dTTP) à une concentration de 100 µM chacun.

14. Séquence nucléotidique comprenant :

- la séquence représentée sur la figure 2 du gène *torA* codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Shewanella C*,

10 * ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour la protéine TorA de *Shewanella C*, dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 6,

15 * ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 2,

- * ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides,

20 - la séquence partielle représentée sur la figure 3 du gène codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Photobacterium phosphoreum*,

- * ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum* dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 7,

25 * ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 3,

30 * ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides,

- la séquence partielle représentée sur la figure 5 du gène codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Salmonella typhimurium*,

* ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour la protéine TorA de *Salmonella typhimurium* dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 8,

* ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 5,

* ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides.

15. Séquence peptidique codée par une séquence nucléotidique selon la revendication 14, et comprenant :

- la séquence en acides aminés représentée sur la figure 6 de la protéine TorA de *Shewanella C*,

* ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 6,

* ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 5 acides aminés,

- la séquence partielle en acides aminés représentée sur la figure 7 de la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum*,

* ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 7,

* ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au

moins environ 5 acides aminés,

- la séquence partielle en acides aminés représentée sur la figure 8 de la protéine TorA de

Salmonella typhimurium,

5 * ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 8,

10 * ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 5 acides aminés.

substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 3,

- 5 - ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides.

L'invention concerne également toute séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 3, et comprenant :

- 10 - la séquence partielle en acides aminés représentée sur la figure 7 de la protéine TorA de *Photobacterium phosphoreum*,

- ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 7,

- 15 - ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 5 acides aminés.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique comprenant :

- 20 - la séquence partielle représentée sur la figure 5 du gène codant pour la protéine TorA de la bactérie marine *Salmonella typhimurium*,

- ou toute séquence dérivée de la séquence susmentionnée par dégénérescence du code génétique, et codant pour la protéine TorA de *Salmonella typhimurium* dont la séquence peptidique est représentée sur la figure 8,

- 25 - ou toute séquence dérivée de la séquence nucléotidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs nucléotides, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 5,

- 30 - ou tout fragment de la séquence nucléotidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 15 nucléotides.

L'invention concerne également toute séquence peptidique codée par la séquence nucléotidique susmentionnée représentée sur la figure 5, et comprenant :

- la séquence en acides aminés représentée sur la figure 8 de la protéine TorA de *Salmonella typhimurium*,

- ou une séquence dérivée de la séquence peptidique susmentionnée, notamment par substitution, suppression ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, ladite séquence dérivée ayant de préférence une homologie d'environ 35 % à 100 % avec la séquence peptidique susmentionnée représentée sur la figure 8,

- ou un fragment de la séquence peptidique susmentionnée, ou d'une séquence dérivée de cette dernière telle que définie ci-dessus, ledit fragment étant de préférence constitué d'au moins environ 5 acides aminés.

10 L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'obtention d'amorces de l'invention, et de leur utilisation pour la mise en oeuvre d'un procédé de détection selon l'invention.

Description des figures

- la figure 1 représente l'alignement des séquences nucléotidiques des gènes *torA* de *Shewanella massilia* (*torA/S.m.*), de *Shewanella C* (*torA/S.c.*), et de *Shewanella putrefaciens* (*torA/S.p.*).

- la figure 2 représente la séquence nucléotidique complète du gène *torA* codant pour la TMAO réductase de *Shewanella C*.

- la figure 3 représente la séquence nucléotidique partielle du gène *torA* codant pour la TMAO réductase de *Photobacterium phosphoreum*.

- la figure 4 représente l'alignement des séquences nucléotidiques des gènes *torA* de *Shewanella massilia* (*torA/S.m.*), de *E. coli* (*torA/E. c.*), de *Rhodobacter sphaeroides* (*TorA/R.s.*), et *Rhodobacter capsulatus* (*TorA/R.c.*). Les flèches indiquent la position des différentes amorces sur le gène *torA* de la bactérie *Shewanella massilia*, élaborées à partir des régions conservées. Plus particulièrement, les positions des différentes amorces « DDN » et « BN » sur le gène *torA* de *S. massilia* sont les suivantes :

DDN1+ : 620	BN1+ : 1628
DDN5+ : 1428	BN3+ : 621
DDN2- : 1684	BN6+ : 1657
DDN3- : 2201	BN2- : 2403
DDN4- : 2325	BN4- : 2023
DDN5- : 1450	BN5- : 946

Figure 1

```

toR/S.m. : ----- 20 40 60 80 100 120
toR/S.c : ----- ATGACAGAGAGACTTTTAAAGGTAATCCCTCAATCT--CTTTCGTTGCTTAAGTGGACCTCAGTGTAAAGCCCTTAAATGCTTAC--CAAAGCGGC
toR/S.p. : ----- ATGACAGAGAGACTTTTAAAGGTAATCCCTCAATCT--CTTTCGTTGCTTAAGTGGACCTCAGTGTAAAGCCCTTAAATGCTTAC--CAAAGCGGC
toR/S.m. : ----- 140 160 180 200 220 240 260
toR/S.c : ATCA-----ATGAAAGTGAATGGCTAAC--ACAGGTTACACCTTCGGCGCCCTTAAATGAAGCGCAAAACGGCGTCAATTCGCCGAAGTGAACCCCTTGACCTTAGATTAAGTATCAGATATGAT
toR/S.p. : CTGA-----ATGAAAGTGAATGGCTAAC--ACAGGTTACACCTTCGGCGCCCTTAAATGAAGCGCAAAACGGCGTCAATTCGCCGAAGTGAACCCCTTGACCTTAGATTAAGTATCAGATATGAT
toR/S.m. : ----- 280 300 320 340 360 380
toR/S.c : TAAAGGCATCCGGGCATGGCTTACATCATCCATCGCGTACCTTACCTATGGTGGCGCTTAAGATTTTAAAGTCAAAAGTCAATTAAGATTAATCCATCAAGGGGTGATTTCCGCTTTGTTCCGTTAACG
toR/S.p. : TAAAGGCATCCGGGCATGGCTTACATCATCCATCGCGTACCTTACCTATGGTGGCGCTTAAGATTTTAAAGTCAAAAGTCAATTAAGATTAATCCATCAAGGGGTGATTTCCGCTTTGTTCCGTTAACG
toR/S.m. : ----- 400 420 440 460 480 500 520
toR/S.c : TGGGCAAGGCAATTAACACTGTTTAAAGCAATTCATTAAGTGAAGTCCAAACCAATAGGTCATCAGGTCGTGATCGGGCAAAACGGTTGGCGGCCACTGGTCAACTGCAATTCAGACAGAGTCATA
toR/S.p. : TGGGCAAGGCAATTAACACTGTTTAAAGCAATTCATTAAGTGAAGTCCAAACCAATAGGTCATCAGGTCGTGATCGGGCAAAACGGTTGGCGGCCACTGGTCAACTGCAATTCAGACAGAGTCATA
toR/S.m. : ----- 540 560 580 600 620 640
toR/S.c : TGCACGCTGCGG--TGGGGATGCACGGCAACTATGTAAAGAAATTCGGCACTACTCCACAGGTGCAGGCCAAACCTATTTCTGCTTAAGTTCACACCGAAGTGTATGCCAGGCACTTCATGCG
toR/S.p. : TGCACGCTGCGG--TGGGGATGCACGGCAACTATGTAAAGAAATTCGGCACTACTCCACAGGTGCAGGCCAAACCTATTTCTGCTTAAGTTCACACCGAAGTGTATGCCAGGCACTTCATGCG
toR/S.m. : ----- 660 680 700 720 740 760 780
toR/S.c : CGCTGATCTTAAGACACAGCGCACTATCGCTGTGTCGTAAGACGATCCGTACAAAGAACTGCAAGTGGGTGCAATCGCGAAACCATGATATCTTTTGCTTATCTTGCGCAGTAAAGAGTGA
toR/S.p. : CGCTGATCTTAAGACACAGCGCACTATCGCTGTGTCGTAAGACGATCCGTACAAAGAACTGCAAGTGGGTGCAATCGCGAAACCATGATATCTTTTGCTTATCTTGCGCAGTAAAGAGTGA
toR/S.m. : ----- 800 820 840 860 880 900
toR/S.c : GCAAGCGAAGATCCCGGTGATCACTATGACACCCCTGNGGTACTTAAGACCCAAAGCCCTATTTGGGCTGCGAGCACTCTAC-----GTTAACCCACAGACAGATGTGACTTAAATGCTGGCCATCGCC
toR/S.p. : GCAAGCGAAGATCCCGGTGATCACTATGACACCCCTGNGGTACTTAAGACCCAAAGCCCTATTTGGGCTGCGAGCACTCTAC-----GTTAACCCACAGACAGATGTGACTTAAATGCTGGCCATCGCC
toR/S.m. : ----- 920 940 960 980 1000 1020 1040
toR/S.c : CACGAGATGATCAGCAAAAAGCTCTTACGACGATTAATTTTATCCAAAGGCTTACAGCTTAAGGTTTGAAGAGTTTGCCCTATGTGATGATGGCTAGCAAAACCCAGAAATGGGCCCGCGC
toR/S.p. : CACGAGATGATCAGCAAAAAGCTCTTACGACGATTAATTTTATCCAAAGGCTTACAGCTTAAGGTTTGAAGAGTTTGCCCTATGTGATGATGGCTAGCAAAACCCAGAAATGGGCCCGCGC

```

[illegible]

Figure 1 (suite 2)

```

toRA/S.m. : TTGGTGCAGTCATGCCATCCAGACAAACGTTTACACTGCGAGATGTGTGATGCGCGAGAAATACCCCGAGACTTACGACATCAATGCGCGGTGAGCCCTGTGTATATCAGCCCTGTGCGACGCAAAAGCAGT
toRA/S.c : TTGGTTCAGTCATGCCACCCAGACAAACGTTTACACTGCGAGATGTGTGATGCGCGAGAAATACCCCGAGACTTACGACATCAATGCGCGGTGAGCCCTGTGTATATCAGCCCTGTGCGACGCAAAAGCAGT
toRA/S.p. : GTGGTGCATCTTGCCCATCCGGATCACCGCTTACACTCACAATGTGTGATGCAAAAGAAATACCGCGAAACCTACACAGTTAAATGTGCGCGAACTGTGTATATTAAGCCCTGAAAGATCTAAACCCGT

2220
toRA/S.m. : GGCAATCAAAAGATGGCGATATAGTGGCAGTCTTTTAAACGACCGTGCACCACTGTGCGCGGTGCTGTGTGTATGGGACAACTTCCCTAAAGGGAATTGTGCGAAATTACGAAAGCGCGGTGTATGGCCAGTAG
toRA/S.c : GGCAATCAAAAGATGGCGATATAGTGGCAGTCTTTTAAACGACCGTGCACCACTGTGCGCGGTGCTGTGTGTATGGGACAACTTCCCTAAAGGGAATTGTGCGAAATTACGAAAGCGCGGTGTATGGCCAGTAG
toRA/S.p. : GGCAATTAAGATGGCGATATCTGCGGGTCTTTTAAACGACCGATCACTGTATGCTGCGCGAGTGTGGATCGTTTCCCTAAAGGTGTATGGCAATTCAATGAAGTGCATGGTATGGCCAGTAGG

2360
toRA/S.m. : GTAAAGANGTACCACTGAAGGTGGTGTGAAGTCGGCGCCCTGTGTAGTTATGGCATCTTAACACCCCTACACTTAGACATAGGCAACCTCTTAACCTTGAACATAGGCAACCTCTTAACCTTGAACATAGGCAACCTCTT
toRA/S.c : GTAAAGANGTACCACTGAAGGTGGTGTGAAGTCGGCGCCCTGTGTAGTTATGGCATCTTAACACCCCTACACTTAGACATAGGCAACCTCTTAACCTTGAACATAGGCAACCTCTT
toRA/S.p. : GTAAAGATGCAAGCTTGAAGGCGCGGAAATCGGTGCCCTGTGCACCTATGGTGAACCTTAATACCTTAACCTTAAGACATTGTGACTTAAGTGGCTCAAGCTTGTCTCAGCCTATACATGTCTGTGT

2480
toRA/S.m. : CGAGTTTGAAAAATACCAAGGCAAGTGCCTTAAGTCAAGTCCCTTCGATGGCGCGATCGAAGTCGAAATC
toRA/S.c : CGAGTTTGAAAAATACCAAGGCAAGTGCCTTAAGTCAAGTCCCTTCGATGGCGCGATCGAAGTCGAAATC
toRA/S.p. : TGAGTTTGAAAAATACCAAGGTAAGCAACCTTAAGTTAGTCTTCGATGGCTCTATCGAAGTTGAAATC

```


Figure 2

torA/Shewanella C

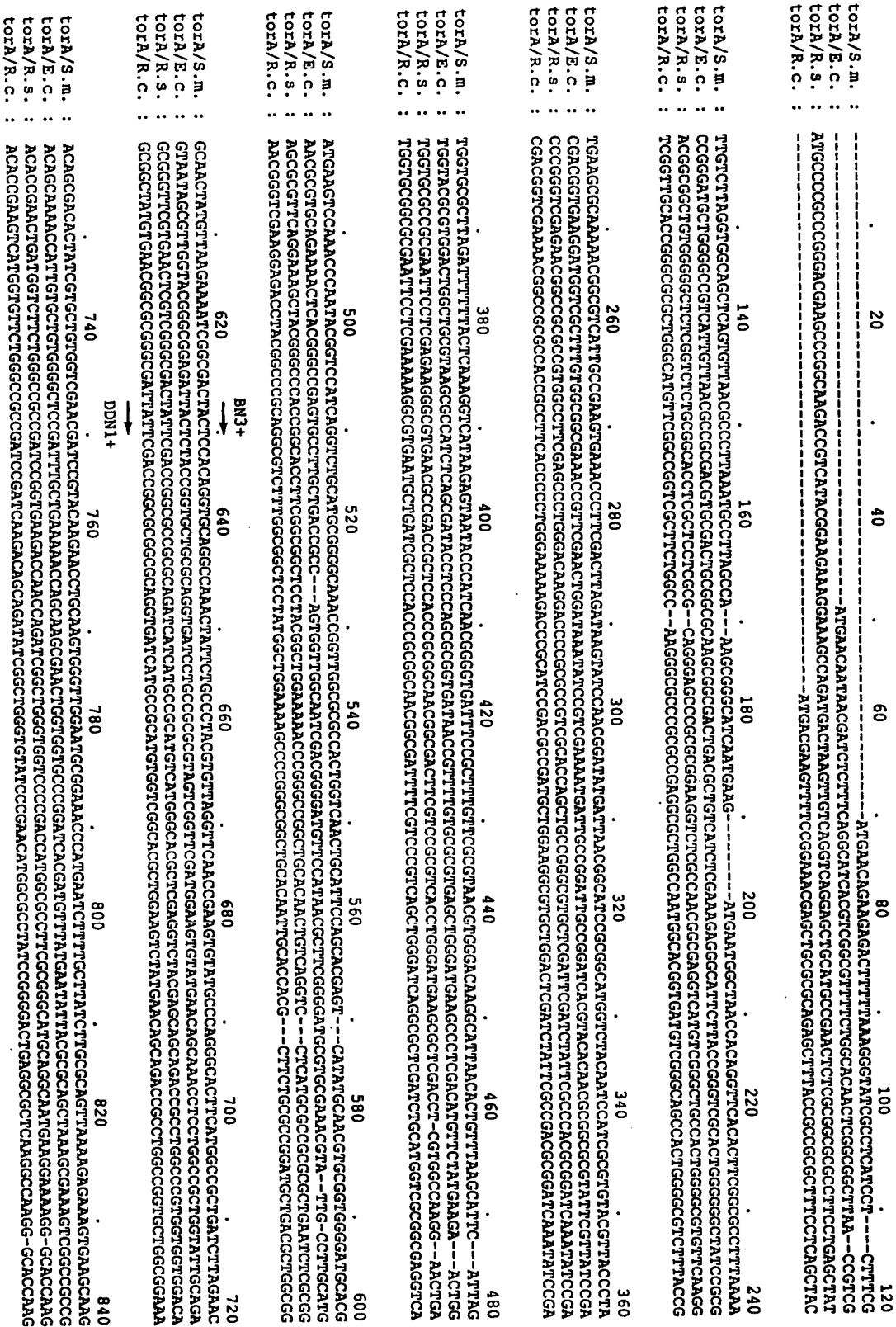
ATGAACAGAAGAGACTTTTTAAAGGGTATCGCCTCATCCTCTTTCGTTGTCTTAGGTGGCAG
CTCAGTGTTAGCGCCCTTAAATGCCTTAGCCAAAACGGGCATCAATGAAGACGAATGGCTAA
CCACAGGTTACACTTCGGCGCCTTTAAAATGAAGCGCAAAAACGGCGTCATTGCCGAAGTG
AAACCCTTCGACTTAGATAAGTATCCAACGGATATGATTAACGGCATCCGCGACATGGTCTA
CAATCCATCGCGTGTACGTTACCTATGGTGCGCTTAGATTTTTTACTCAAAGGTCATAAGA
GTAATACCCATCAACGGGGTGATTTCGCTTTGTTTCGTGTAACATGGGACAAGGCATTAACA
CTGTTTAAGCATTTCATTAGATGAAGTCCAAACCCAATACGGTCCATCAGGTCTGCATGCGGG
TCAAACCTGGTTGGCGCGCCACGGGTCAACTGCATTCCAGCACGAGTCATATGCAACGTGCGG
TGGGGATGCACGGCAACTATGTGAAGAAAATCGGCGACTACTCCACAGGTGCAGGCCAAACA
ATTCTGCCCTACGTGTTAGGTTCAACCGAAGTGTATGCCCAAGGCACTTCATGGCCGCTGAT
CTTAGAACACAGCGACACTATCGTGCTCTGGTGAACGATCCGTACAAGAACCTGCAAGTGG
GTTGGAATGCGGAAACCCATGAATCTTTGCTTATCTTGCGCAGTTAAAAGAGAAAGTGAAG
CAAGGCAAGATCCGTGTTATCAGTATCGACCTGTGGTGACTAAGACCCAAGCCTATTTGGG
CTGTGAGCAACTCTACGTTAACCCACAGACAGCGTGACTTTAATGCTGGCCATCGCCACG
AGATGATCAGCAAAAAGCTCTACGACGATAAATTTATCCAAGGCTACAGCTTAGGTTTTGAA
GAGTTTGTGCCCTATGTGATGGGTACTAAAGATGGCGTAGCCAAAACCCCAAGATGGGCCG
GCCTATCTGTGGTGTGAAGCCCATGTTATCCGCGACTTGCTAAAACCTTAGTCAAGGGCC
GCACTCAGTTCATGATGGGCTGGTGTATCCAGCGCCAGCAACACGGCGAACAACCTATTGG
ATGGCGGCGGTACTGGCGACCATGATCGGCCAAATCGGTCTACCCGGTGGTGGCATCAGTTA
TGGTCACCACTACTCGAGTATCGGCGTGCTTCATCGGGTGCCGCGGCCAGGTGCTTTCC
CCCGTAACTTGGACGAAAATCAAAGCCACTATTTGATAGCTCAGACTTCAAGGGCGCGAGC
AGCACAATTCGGGTGCCCCGCTGGATTGATGCGATTCTCGAACCTGGTAAAACCATTGATGC
TAACGGCTCGAAAGTGGTTTATCCCGATATCAAGATGATGATTTTCTCGGGTAATAATCCTT
GGAACCATCACCAAGACAGAAACCGTATGAAGCAAGCCTTCCATAAGCTTGAGTGTGTGGTC
ACTGTTGATGTGAACCTGGACGGCAACTTGCCGCTTCTCGGATATCGTACTACCCGCTTGATC
TACCTATGAGCGCAACGATATCGACGTTTACGGCGCCTATGCTAACCGCGGTATTTTAGCCA
TGCAGAAAATGGTTGAGCCACTGTTTGATAGCTTGTCGGATTTTGAAATTTTCACTCGCTTT
GCCGCCGTACTTGGTAAAGAGAAAGAATACACCCGTAACATGGGCGAAATGGAGTGGCTAGA
AACCCTCTATAACGAATGTAAAGCCGCCAACGCGGGCAAGTTTGAGATGCCTGACTTTGCCA
CTTTCTGGAAACAAGGTATGTGCATTTTGGTGACGGTGAACCTGGACGCGCCATGCAGAC
TTTAGAAACGATCCTGAAATCAATCCACTAGGCACGCCTTCAGGTTTGATTGAAATCTTTAG
CCGTAAGATTGATCAATTCGGTTACGATGACTGTAAAGGTCACCCAACCTGGATGGAGAAAA
CCAGACAAACGCTTACACTCGCAAATGTGTGAGTCGCGAGAATACCGCGAGACCTACGCAGT
CAATGGCCGTGAGCCTGTGTATATCAGCCCTGTGACGCAAAAGCGCGCGGCATAAAAGATG
GCGATATAGTGCGAGTCTTTAACGACCGTGGCCAACTGTTGGCGGGTGACGTGGTATCGGAC
AACTTCCCTACTGGTATTGTGCGGATTCACGAAGGCGCATGGTATGGGCCAGTAGGTAAAGA
TGGTAGCACTGAAGGTGGGGCTGAAGTCGGCGCCCTGTGCAAGTTATGGCGATCCTAACACCC
TCACTTTAGACATAGGCACATCTAACTTGCCCAAGCTTGCTCAGCCTATACTTGCTTAGTC
GAGTTTGAGAAATACCAAGGCAAAGTGCCTAAGGTGAGCTCCTTCGATGGCCCTATCGAAGT
CGAAATC

Figure 3

Photobacterium phosphoreum

5'ACAATACTGAAAGATTGTAAGACATTGATATGGTGGTCAAATGATCCGATT
AAAAACAGTCAGGTTGGCTGGCAGTGTGAGACTCATGGTTCTTATGAGTATTA
TGCGCAATTAAAGCAGAAGGTCGCAGATGGTGGGATCCGTATGATCTCGGTCG
ATCCTGTAGTGTTCGAAATCGCAAAAATATTTTAACTGTGAGCACCAATACGTC
AATCCTCAAACCTGACGTTCTTTTCATGCTTGCTATTGCGCATACATTGTATAA
AGAAGATCTGTACGATAACAATTTCTGGAACTTACACTTTAGGCTTCAATG
AATTCTTGCCTTACTTATTGGGTACAGGCCAAAGATAAAATAGCCAAAACGCCA
GAATGGGCAGAGCCAATTTGTGGCGTTAAAGCAGAGGCTATTCGAGAATTTGC
TCGCGGATTAGTTAAAAACCGTACGATGATAATGTTTGGTTGGGCTGTACAGC
GTCAACAACACGGTGAGCAGCCTTATTGGATGGGAGCAGTGCTGGCTTCGATG
TTAGGCCAAATAGGCTTACCTGGTGGAGGGATTTCCCTATTCTCACTTTTACAG
TGGCGTTGGGTACCTTTTCAGTACTGCAGCTGGGCCGGGGGGGATTTCCGCGTA
ATGTTGATGAAGGCCAACAGCCGATTTGGAATAATAACGATTTTAAAGGCTAC
AGTTTCGACAATTCCGGTCGCAAGATGGATTGATGCGATCATGGAACCAGGTAA
AAAAATTCAATATAACGGCGCTAATGTGGTGTTGCCTGATATTAAGATGATGG
TCTTTAGTGGTTGTAATCCGTGGAATCATCATCAACAACGTAATCGTATGAAA
CAAGCATTTAGAAAGCTGCAAACCGTGGTTAATATTGATTATACATGGACACC
AACCTGTCGTTTTTCCGATATTGTATTACCTGCTTGTACCCAATTTGAGCGTA
GTGATTTAGATCAATATGGTACTTATTCAACTAGCGGTATTTTAGCGATGCAT
AAGCTAATTGATCCGCTTTATCAATCAAAAACAGACTTTCAGATATTTACTGA
ATTAACCGAACGCTTTGGGAAA 3'

Figure 4



toR/S.m. : toR/E.c. : toR/R.s. : toR/R.c. :	1700 1720 1740 1760 1780 1800	TACGGCCCTTGTCTAACCGCGGATTTTATGACCATGACAGAAATGTTGAGCCACTGTGATAGCTTGTGCGATTTTGAAATTTTCA-CTCGCTTGGCGGCCCTACTCGGCAGAGAA TAGGCATCTCTCAACCGCGCATTTACGCATGCAAGAGGTGTCGCCGCGAGTTGAGAGCGCCGAACGACTTGATATTTTCCGAGAGCTGTGCGCTTAAATCCG-GAAGA GTGGCGCATCTCAACCGCGCATCTCTCGGCATGAAGAGGTGTGATTCGCTCTACAGAGCCGCTGCAATCAACATCTTCCAGACCCCTG-CGCCAAGCGCTGGCGAAGGCCAA ATCGCGCATTTATCGAACCGCGCATCTCTGGCGATGAAGAAATCTGCGAGCCGCTTTACGAAGCCCGCAGACGATTAACAGATCTTCCGCCGGTTC-EGCGAAGCGCTGGCGAAGGCCAA
toR/S.m. : toR/E.c. : toR/R.s. : toR/R.c. :	1820 1840 1860 1880 1900 1920	AGAATACACCCCGTAACATGGCGGAAATGGATGGTTGATGAAGAACCCCTCTATACGAA--TGTTAAAGCC-CCCAACGCGCGCGAAGTTTGAGATCGCTC-ACTTTGGCACTTTCGAAACA-- AGCCTTACCGAAGGCGTGACGAAATGGCGTGCCTGCAAGCATCTGCGAGAGAGGTGTACACAGCAAGCAAGCAGCGCGCTTCAATCTGCGAG-CGTTTGAGAGACTTCTGTGATAC- GGAATTCACCGAAGCGCGCGCAAGATGGCTGAGATAGCTGTCTTACAGAGCGCGGGTGAACAGCGCGGATTCAAGAGATGGAATGCGCT-CGTTTGAGAGACTTCTGTGATAC- GGAGTTACCGAAGCGCAAGGACGAGATGGCGTGGATCAAGTCTTACAGAGATGCGCGCCCAAGCAGCGCAAG-CCGCGGCTTCAGAGATGCGCGCCCTTTCGAGCGCTTCTGGCGGAAG
toR/S.m. : toR/E.c. : toR/R.s. : toR/R.c. :	1940 1960 1980 2000 2020 2040	----AGTTATGTCGATTTTGGTGAACGGTGAAGTCTGCAACGGCCCATCGAGACTTGAAGAACATCTGAAATCAATCCACTAGGCAAGCCCTTCAAGCTTGAATTAATCTTAACTGAGCTTA --AAAGATCTGCGATTTTGTGACCAATCCGAGATGTTTGTGCGCCACAGGATTTCCGCGAAGATCCGGAATCTCGAAGCGCTGGCGACCCGCGCTGATGAGATCTCTACGAA GGATCTGCGATTTCCCGATCACGAGGGCGCGAATCTGTTGGCTATGGCGACTTCCCGAGGATCCGCTGTTACACCCCTCGGACAGCCCTCGGCGCTGATGAGATCTACTCGAAGA GGATCTGGAATTCGCCGTCACCGACGGCGCGGACTTGTGCGCTATGCGACTTCCGGAAGATCCGCTGTCACCCGCTGGCGACCGCGACCGGCTGATGAGATCTACTCGAAGA
toR/S.m. : toR/E.c. : toR/R.s. : toR/R.c. :	2060 2080 2100 2120 2140 2160	AGATTGATCAATTTGGTTCGATGACTGTAAAGTCAACCCAGCTGATGGAAGAAACCGAGCGTATGCTATGCGCGCCCTCGCTCTGACAAAGCATCCGATTTGGTTCATCTCATGCTCATC CTATGCGCGATTAAGATCAAGATGTTGTAGGGGCGCATCGATGTGTTTGAAGAAATGCAAGCGTCCCAAGGCGGCGCTGCTCGCAAAATGATCCGATTTGATCTGCAATCTGTGCAATC ACATCGAAGATGGGCTTGAAGATGTCGCCGCGCATCCGACTGATGAGAACCGCTTGACCG---CTCGAGCGGCGCGGGCG---AAATATCCGCTGCAATTCGCGCTGCC-ACC ACATCGAAGATGGGCTTGAAGATGTCGCCGCGCATCCGACTGATGAGAACCGCTTGACCG
toR/S.m. : toR/E.c. : toR/R.s. : toR/R.c. :	2180 2200 2220 2240 2260 2280	DNM3- -----G-TGAGTGTGCGAG-AAATCCGCGAGCTTACGAGTCAATGGCGCTGTGACGCTGTGTATATACGCCCTGTGTCAGCGCAAAAGCGACGCTG CAGCAACGTTTACATCCGAGATGT-----G-TGAGTGTGCGAG-AAATCCGCGAGCTTACGAGTCAATGGCGCTGTGACGCTGTGTATATACGCCCTGTGTCAGCGCAAAAGCGACGCTG CGAATTTCCGATCTCACTCCGATTA-----G-TGAGTGTGCGAG-AAATCCGCGAGCTTACGAGTCAATGGCGCTGTGACGCTGTGTATATACGCCCTGTGTCAGCGCAAAAGCGACGCTG CGATCTCGCGGTGCACTCGA-----GCTGAAGCGACCTGCGTGGCGACCTCTATGCGGTGCGGCGACAGAGCCCTGTGCTGATGCAACCCGACGACGCGCGCGCGCGG CGTTCAACCGG-TGTACTGCAACCCGCTTCAACGCGCTCAACGCGACGCTGCTGCGCGCAAGGCTATGCGGTGCAAGGCGACAGAGCCCTGTGCTGATGCAACCCGACGACGCGCGCGCGG
toR/S.m. : toR/E.c. : toR/R.s. : toR/R.c. :	2300 2320 2340 2360 2380 2400	DNM4- CATCAAGATGGCGATTAAGTCGAGTCTTTTAAAGCACTGGGCGCACTGTGGCGGGGTGCTGTGATCGACACATCTCCCTAAAGGATGTGCGCAATTCACGAAAGCGCGCTGTATGG TATTCGATGAGGTGATGTGGAAGCGCTTTTAAAGCTGCGGCTCAAGTATGCGAGGGCGAGTGTGATGACCGGATGATGACCGGCGGATTCAGCGGCGGATTCAGAGGCGGCTGTGATGA CATTCGCGAGCGGCGATGTGCTCGGGGTCTTCAACAGCCGCGCGAGATCTCTGTTGGCGCGAAGGTGACGCGCGGATGACCGGCGGATTCAGAGGCGGATTCAGAGGCGGCGCTGTGATGA CATCGCGGATGGCAGCGTGTGCGGTGCAATGATGCGGCTCAATCTGACCCGGGTCAAGGTGACCCGATGCGCGGTGATGAAGGGGTAAATCAAGATCTACGAAGAGGGCGGTGTGATGA
toR/S.m. : toR/E.c. : toR/R.s. : toR/R.c. :	2420 2440 2460 2480 2500 2520	GCCAGTAGTAAAGTGTGACACTGAAGGTGTGCTGAAAGTGGCGCGCTGTGATGTATGGCGATCTTAACACCCCTCACTTTAGACATAGGCACCTCTTAACCTTGGCCAAAGCTTGTCTC TCCAG---ATPAA-----G-----GCGCGAGCTGTGGTGCCTGTGCAATACGGTAAACCCCAAGCTGTGATCCATCAATCGGATCGGAGCTGCGCGAGCGACGAC CCGCGTGCAC---C-----CCTCGAGGAAGGACGCTGCAAAATACGCGCAATGAAACGCTGTGCTGCGCTGCGACCTTCGCGATTCGCGATTCGGAATCTGCTGTCCGCCATATTCGCGATTCGGAATCTGCGCGACGCACTG TCCCTCGAC---G-----TGACGAGCGCGGAGCGCTGCAAAATACGCGCACTTAACTGTCTGTCCGCCATATTCGCGATTCGGAATCTGCGCGACGCACTG

Figure 4 (suite 3)

```

torA/S.m. : AGCCTACTTGCCTTAGTCGAGCTTGA AAAA TACC AAGC AAAGTCCCTAAGTCA GTCCTTCGATGGCCCGATCGAAGTCGAATC 2540
torA/E.c. : TGGGCACACTACGCTGCTGTGAATTGAACTACAAGCAACAGTGAGCAGAGTACGGCGTTTAACGGCCCCGTGAGATGTGGCGCAGTGGCAATATGTTCCCGCGTCGAGTGAA 2640
torA/R.s. : CGGCCAGACCATCTCCGCGGATGTCGAAAAATATATCGGGGCGCCCGCGGTGACGGTGACCGGTGTTCCGACACGCCGGAAGGACCC-----
torA/R.c. : TGGTCAGACCCGTGCTGGCCGAGGTCGAAATACACCGGCCCGCCCTCACCCCTGACCGGCTTGGTCGCGCGAAGCGGTCGA-----

torA/S.m. : ----
torA/E.c. : ATCA
torA/R.s. : ----
torA/R.c. : ----
```

Figure 5

Salmonella typhimurium

5' ATGAAACAGGTGGTGTCTGCCGCGAGTTTGAAGCGCGTAACGACTTTGATATT
 TTCCGCGATCTCTGCCGACGCTTTAACCGTGAAGCGGCATTACGGAAGGTCT
 TGATGAAATGGGCTGGCTGAAACGCATCTGGCAGGAAGGGAGCCAGCAGGGAA
 AAGGTCGCGGTATCCACTTACCGATTTTTCGAGGTGTTCTGGAATCAACAGGAG
 TACATCGAGTTTGATCATCCGCAGATGTTTGTACGCCATCAGGCTTTCCGTGA
 AGATCCGGACCTGGAGCCGTTGGGCACGCCAAGCGGTTTGATCGAGATTTACT
 CAAAACCATCGCCGACATGCAATACGACGATGGTCAGGGCCATCCCATGTGG
 TTCGAAAAAATCGAACGCTCGCATGGCGGGGCCGGGATCGCAGCGCTGGCCGCT
 GCACTTACAATCCGTCCACCCTGATTTCCGTCTGCATTCCCAACTGTTGCGAG
 TC 3'

Figure 6

TorA/Shewanella C

MNRRDFLKGIIASSSFVVLGGSSVLAPLNALAKTGINEDEWLTTGSHFGAFKMK
 RKNGVIAEVKPFDLDKYPTDMINGIRDMVYNPSRVRYPMVRLDFLLKGHSNT
 HQRGDFRFVRVTWDKALTLEKHSLEDEVQTQYGPSGLHAGQTGWRATGQLHSST
 SHMQRAVGMHGNVVKKIGDYSTGAGQITLPYVLGSTEVYAQGTSWPLILEHSD
 TIVLWSNDPYKNLQVGWNAETHESFAYLAQLKEKVKQKIRVISIDPVVTKTQ
 AYLGCQQLYVNPQTDVTLMLAIAHEMISKKLYDDKFIQGYSLGFEEFVPYVMG
 TKDGVAKTPEWAAPICGVEAHVIRDLAKTLVKGRTOFMMGWCIQRQQHGEQPY
 WMAAVLATMIGQIGLPGGGISYGHYSSIGVPSSGAAAPGAFPRNLDENQKPL
 FDSSDFKGA SSTIPVARWIDAILEPGKTI DANGSKVVYPDIKMMIFSGNNPWN
 HHQDRNRMKQAFHKLECVVTVDVNWTATCRFSDIVLPACTTYERNIDIDVYGAY
 ANRGILAMQKMVEPLEFDSLSDFEIFTRFAAVLGKEKEYTRNMGEMEWLETLYN
 ECKAANAGKFEMPDFATFWKQGYVHFGDGELWTRHADFRNDPEINPLGTPSGL
 IEIFSRKIDQFGYDDCKGHPTWMEKTERSHGGPGSDKHPIWLQSCHPDKRLHS
 QMCESREYRETYAVNGREPVIISPVDKARGIKDGDIVRVFNDRGQLLAGAVV
 SDNFPTGIVRIHEGAWYGPVGKDGSTEGGAEVGALCSYGDPNTLTLDIGTSKL
 AQACSAYTCLVEFEKYQGVKPKVSSFDGPIEVEI

Figure 7

TorA/P.p. : TILKDCKTLIWWSNDPIKNSQVGWQCETHGSYEYYAQLKQKVA
 TorA/S.m. : GTSWPLILEHSDTIVLWSNDPYKNLQVGWNAETHESFAYLAQLKEKVK
 TorA/E.c. : QTSWPLVLQNSKTIVLWGSDDLKNOQANWWCPDHDVYEYYAQLKRKSA
 DorA/R.s. : QTAWPVVVENTDLMVFWAADPMKTNEIGWVIPDHGAYAGMKALKEK--

TorA/P.p. : DGGIRMISVDPVVSQSQKYFN---CEHQYVNPQTDVPFMLAIAHTLYKED
 TorA/S.m. : QGKIRVISIDPVVTKTQAYLG---CEQLYVNPQTDVTLMLAIAHEMISKK
 TorA/E.c. : AGEIEVISIDPVVTSTHEYLGGEHVKHIAVNPQTDVPLQLALAHTLYSEN
 DorA/R.s. : -G-TRVICINPVRTETADYFG---ADVVSPPQTDVALMLGMAHTLYSED

TorA/P.p. : LYDKQFLETYTLGFNEFLPYLLGTGDKIAKTPEWAEPICGVKAEAIREF
 TorA/S.m. : LYDDKFIQGYSLGFEEFVPYVMGT-KDGVAKTPEWAAPICGVEAHVIRDL
 TorA/E.c. : LYDKNFLANYCVGFEEFLPYLLGE-KDGQPKDAAWAEKLSGIDAETIRGL
 DorA/R.s. : LHDKDFLENCTTGFDLFAAYLTGE-SDGTPKTAEWAAEICGLPAEQIREL

TorA/P.p. : ARGLVKNRTMIMFGWAVQRQOHGEQPYWMGAVLASMLGQIGLPGGGISYS
 TorA/S.m. : AKTLVKGRTOFMMGWCIQRQOHGEQPYWMAAVLATMIGQIGLPGGGISYG
 TorA/E.c. : ARQMAANRTQIIAGWCVQRMQHGEQWAWMIVVLAAMLGQIGLPGGGFQFG
 DorA/R.s. : ARSFVAGRTMLAAGWSIQRMHHGEQAHWMLVTLASMLGQIGLPGGGFGLS

TorA/P.p. : HFYSGVGLPFSTAAGPGGFPRNVDEGQQPIWNNNDLK---ATVRQFRSQD
 TorA/S.m. : HHYSSIGVPSSGAAAPGAFPRNLDENQKPLFDSSDFKGASSTIPVARWID
 TorA/E.c. : WHYNGAGTPGRKGVILSGFSGSTS--IPPVHDNSDYKGSSTIPIARFID
 DorA/R.s. : YHYSNGGSPTS DGPALGGISDGGKAVEGAAWLSESGA---TSIPCARVVD

TorA/P.p. : GLMRSSN
 TorA/S.m. : AILEPGKTIDANG
 TorA/E.c. : AILEPGKVINWNG
 DorA/R.s. : MLLNPGGEFQFNG

Figure 8

```

TorA/S.t. : -----MKQVVSPQFEARNDFDIFRDLCRRFNREAAFTGLDEMGLK
TorA/E.c. : ---RGIAMKQVVPQFEARNDFDIFRELCRRFNREAAFTGLDEMGLK
DorA/R.s. : ---RAILAMKKVVDPLYEARSYDIFAALAERLGKGAFTGRDEMGLS
TorA/S.m. : ---RGILAMQKMVEPLFDSLSDFEIFTRFAAVLGKEKEYTRNMGEMEWLE

```

```

TorA/S.t. : RIWQEGSQQGKGRGIHLPIFEVFWNQOEYIEFDHPQ--MFVRHQAFREDP
TorA/E.c. : RIWQEGVQQGKGRGVHLPAFDDFWNNKEYVEFDHPQ--MFVRHQAFREDP
DorA/R.s. : SFYEAAVKQAEFKNVAMPSFEDFWSEG-IVEFPITEGANFVRYADFREDP
TorA/S.m. : TLYNECKAANAGK-FEMPDFATFWKQG-YVHFGDGE--VWTRHADFRNDP

```

```

TorA/S.t. : DLEPLGTPSGLIEIYSKTIADMQYDDGQGHPMWFEEKIERSHGGPGSQRWPF
TorA/E.c. : DLEPLGTPSGLIEIYSKTIADMNYDDCQGHPMWFEEKIERSHGGPGSQKYP
DorA/R.s. : LFNPLGTPSGLIEIYSKNIKMGYDDCPAHPTWMEPAER-LGGAG-AKYP
TorA/S.m. : EINPLGTPSGLIEIFSRKIDQFGYDDCKGHPTWMEKTERS HGGPGSDKHP

```

```

TorA/S.t. : LHLQSVHPDFRLHSQLLRV-----
TorA/E.c. : LHLQSVHPDFRLHSQLCESETLRH----
DorA/R.s. : LHVVASHPKSRLHSQNGTSLRD-----
TorA/S.m. : IWLQSCHPDKRLHSQMCESEYRE----

```

Figure 9

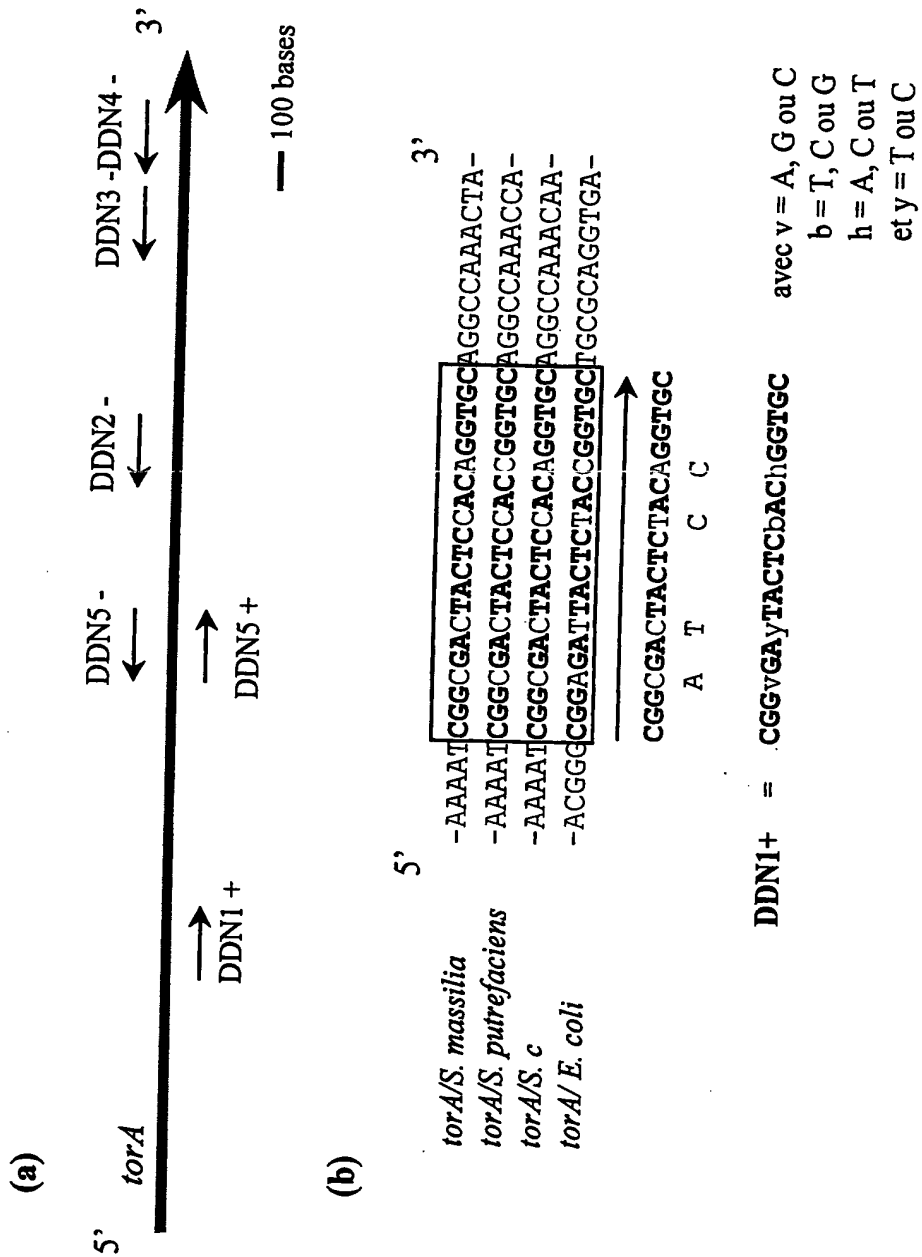


Figure 10

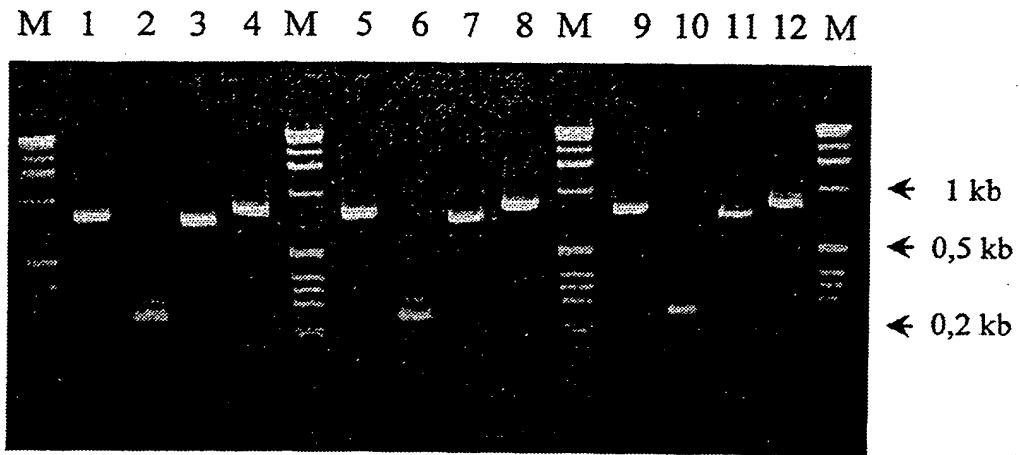


Figure 11

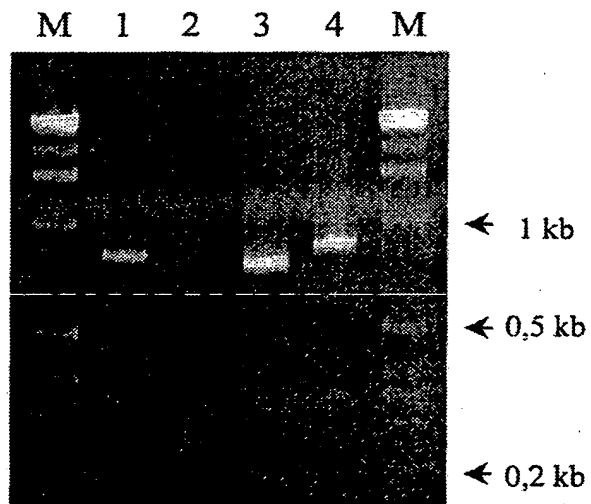


Figure 12

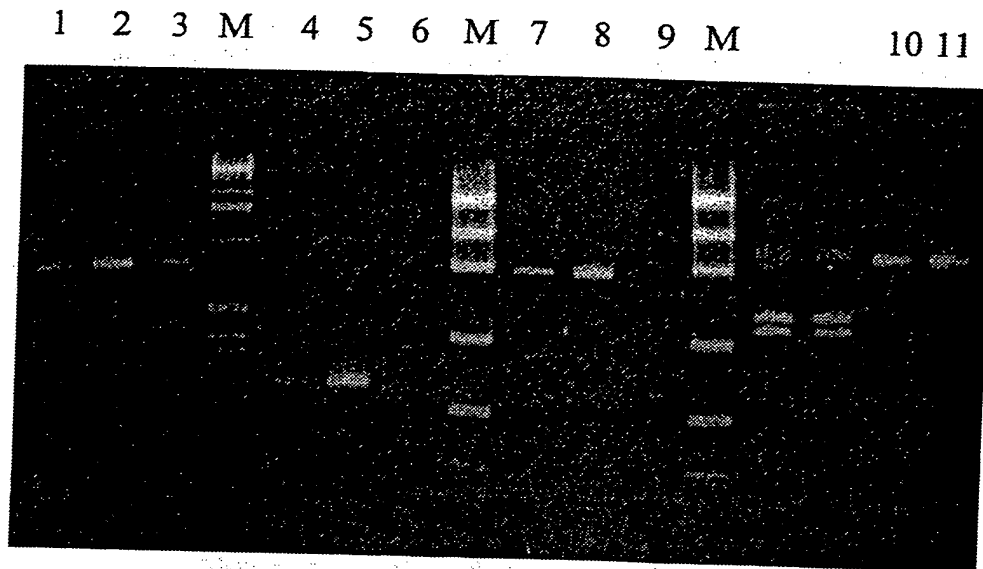
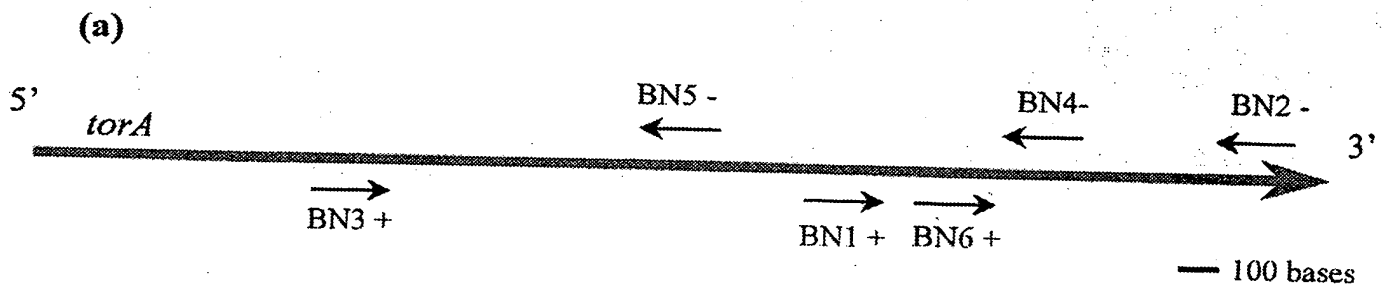


Figure 13



(b)

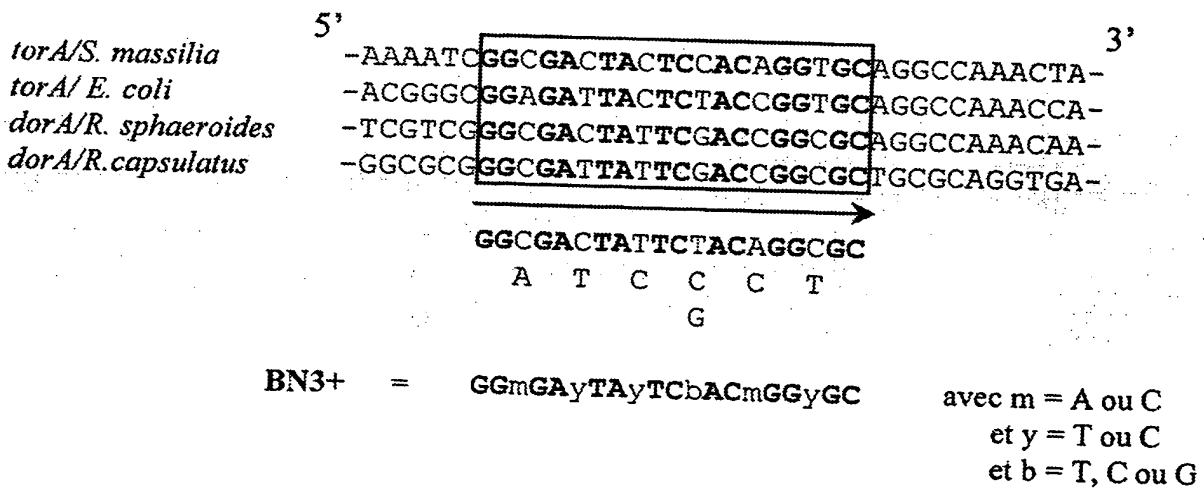


Figure 14

ToC/S.m. :	-----MKWLTNLTWRLNPKPTKALTIGAVSISAFINGIIFWGSGNTALEATNTAEFCISCHMESKPYOELQETVHWSNHGVRATCPDCHVPHNW	:	90
ToC/E.c. :	-----MKLWMLRPRPSARMSVLAIVAIGIYIGIALVLPHVGIKVTSTTEFCVSCSMQP-VYEEYKQSVHFQNASGVRACDCHIPDI	:	86
DoC/R.s. :	MGRSCGASEAKYIGRIWKAFWRPSTKWLGLVLTGIGAGVGNHGFHYVEKTTTEFCISCHSMRDNHYEYKTYLHYQNTSGVRAECADCHVPSG	:	100
	BC1+		
ToC/S.m. :	SRKIARMEASHDVWG-WLNTVNTPEKFEAKRLEMASREWRKFDNLSLACKNCHN-YNSMKWEM-SPLAKOKMKRAAEIDQSCIDCHKGI-AHHLPE	:	186
ToC/E.c. :	PGMWKRIEASNDIYQTFIAHSIDTPEKFEAKRAELAEERWARMKENSATCRSCHN-YVAMDHAKQ-HPEAROMKYAAKDNQSCIDCHKGI-AHQLEPD	:	183
DoC/R.s. :	WKLIRAKLLAAKDLWG-EIRGTIDTREFEAAHRLMAETVWADMKANSDATCRCHS-TEAMDEAHQ-KPEASKOMQOAMNEGTCIDCHKGI-AHKLEPD	:	196
	BC2-		
ToC/S.m. :	MGTARABELIAEVGAGVSSVEYN-QTYYSALTKEPFFTDKQDVE----AGTLNVAITKVKVIETQCKRIKIGIDGMRKKIGAGR---VIYMDFGVNILSAQ	:	278
ToC/E.c. :	MSSGFROEDDVR-ASANDSG---DPLYSIDIKPIYAA-KGDKR---ASSILPASEVKVLRDGDMLQIEITGMT--ESAGRQR-VLTQFPGKRIEVS	:	272
DoC/R.s. :	MASGYRALFSKLEKASQSLKPRKGETIPLRTIEAYLE-KPSGEKAKADGRLLAATPMQVVDVTGDMVQVAVKGMQ-EGAER---VIYEQGKRILENA	:	291
	BC3-		
ToC/S.m. :	LTKDAETGCVIQTEEEKED---PMTGLKMQRIEAIQIWTDKDYLITPELOPLMGYARDTFRSSCSVCHTOPDEAHFDANTWPGMFOGMLAFVNMDOOTQAL	:	375
ToC/E.c. :	IRGDVQOQ---VKTLEKTYV---ADNTNEMSKLOATAMMKKGDMDNDIKPIWAYADSLNCTNQCCHGAPETIAHFDANGWIGTLNGMIGFTSLDKREERT	:	366
DoC/R.s. :	LAPATGS---VVPASMDV---PDTEQWTVDLSLTAWVRNRDLTGQEARLMQYQKQMYNACGCMCHVLPHEHFLANQWIGTLNANKSRAPLDDQFRL	:	385
ToC/S.m. :	VOKYIOEHSSTFVKKEH-----	:	392
ToC/E.c. :	LKYLQMNASDTAGRAHGDKKEK	:	390
DoC/R.s. :	VORVYOMHAKDVEPEGAAE-----	:	404

Figure 15

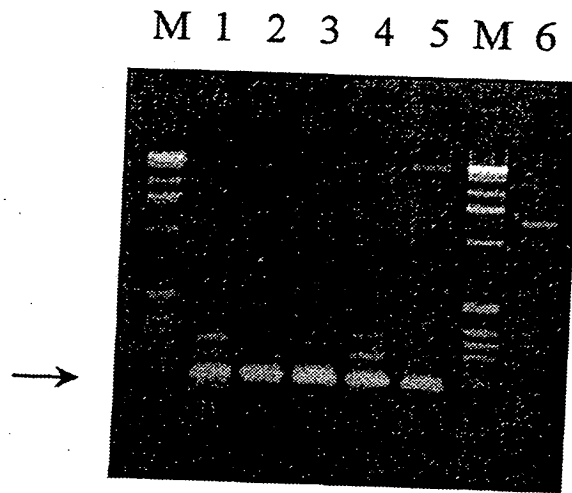


Figure 16

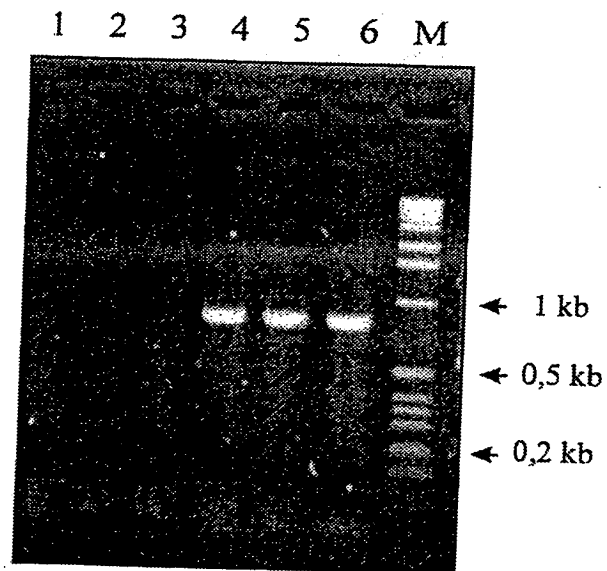


Figure 17

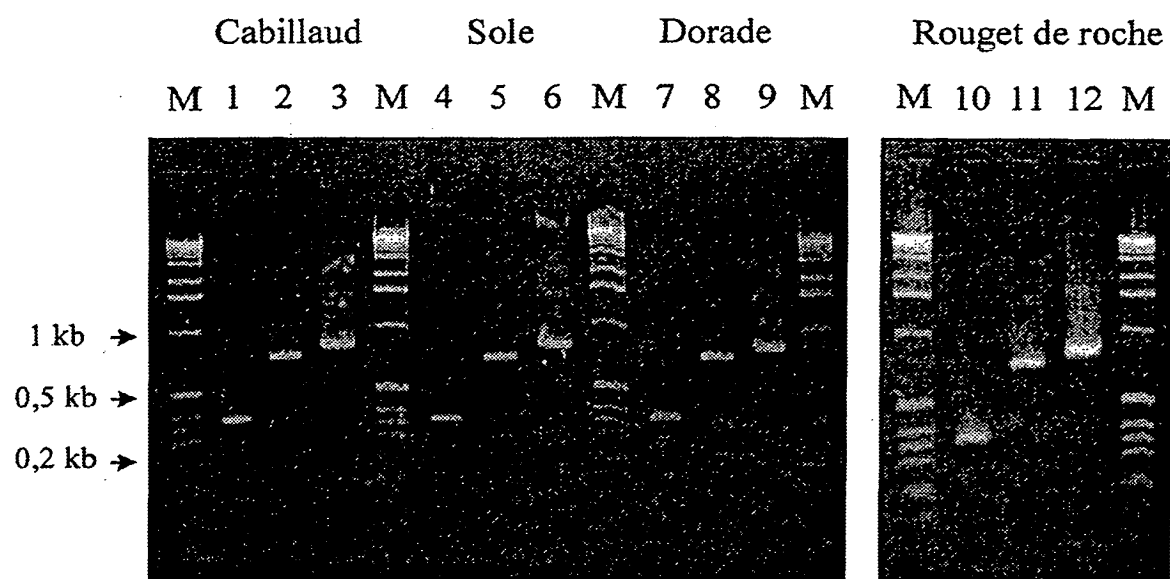


Figure 18

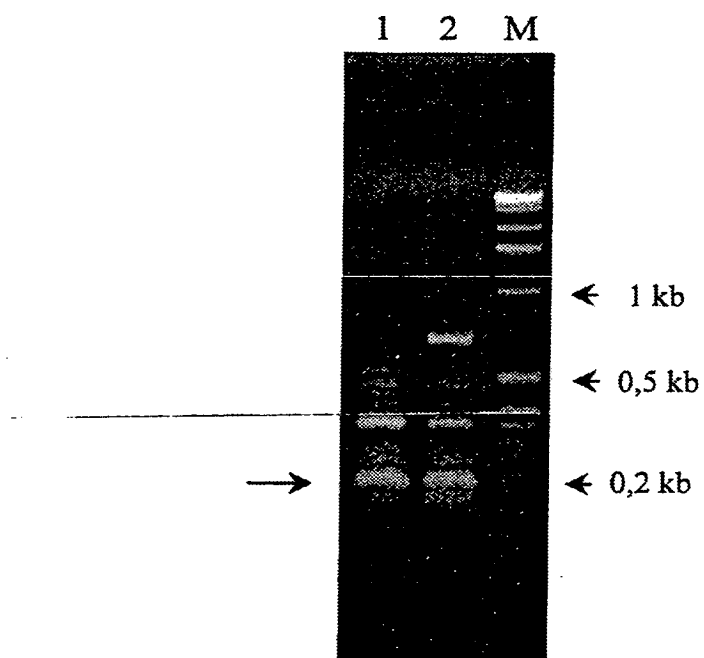


Figure 19

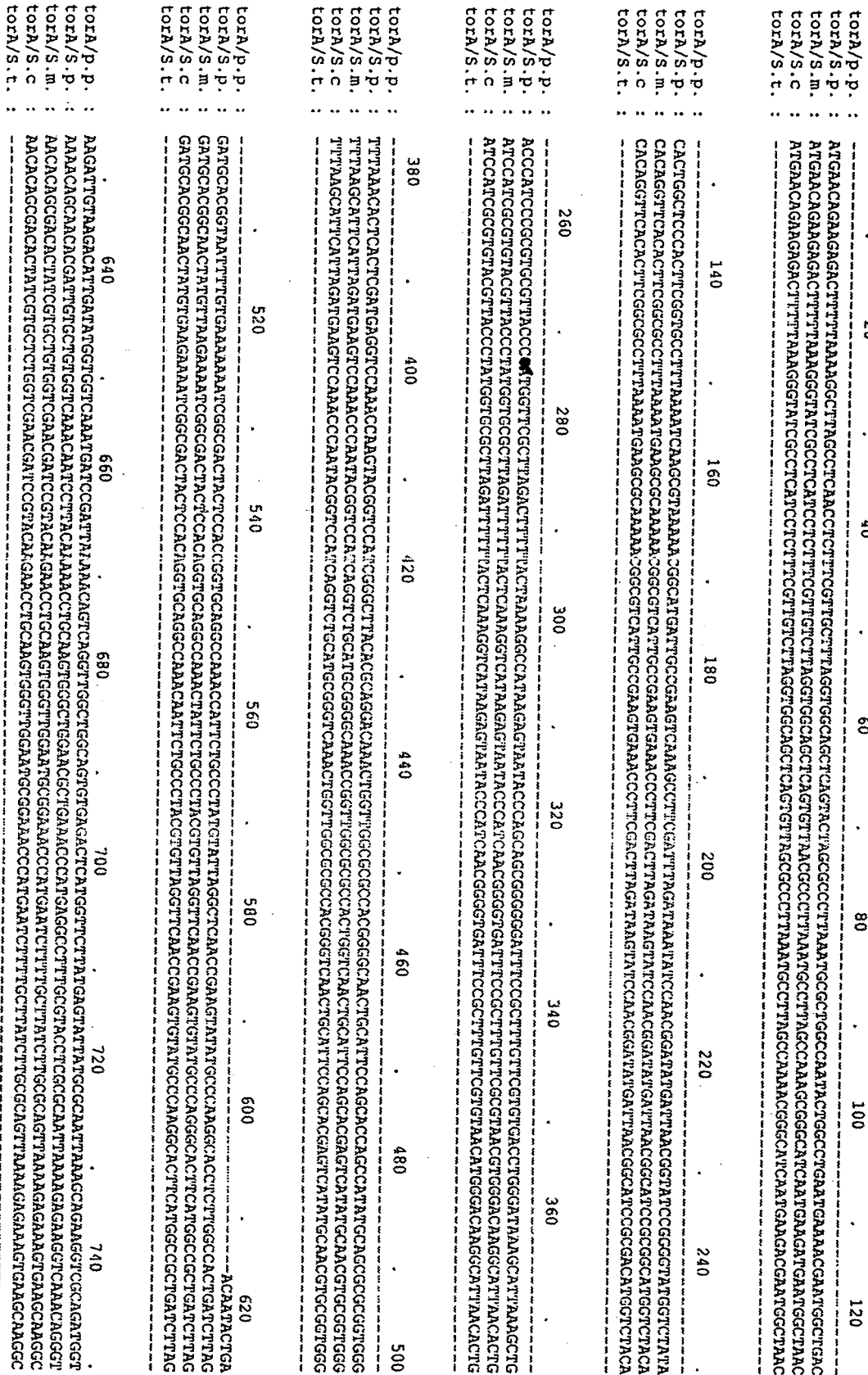


Figure 19 (suite 1)

```

760
torA/P.P. : GGGATCCGATATCTCGGTCGATCTCTGATGTGTCGAAATCGCAAAATATTTTAATCTGTGACACCAATCTGTCATCTTCAACTGACCTTCTTCAATGCTTGCATATTCGATATTCGTA
torA/S.P. : AAAATCCGGGTGATACGATGACCGTGTGATGCTAAACCCAGGCTTACCTTGGCTGTGACGAGTGTATGTGAACCCACAGACTGACGTGACGTGATGCTGGCCATCCGCTAGATGAT
torA/S.m. : AAGATCCGGGTGATACGATGACCGTGTGATGCTAAACCCAGGCTTACCTTGGCTGTGACGAGTGTATGTGAACCCACAGACTGACGTGACGTGATGCTGGCCATCCGCTAGATGAT
torA/S.c : AAGATCCGGGTGATACGATGACCGTGTGATGCTAAACCCAGGCTTACCTTGGCTGTGACGAGTGTATGTGAACCCACAGACTGACGTGACGTGATGCTGGCCATCCGCTAGATGAT
torA/S.t. : -----

780
torA/P.P. : TAAAGAGATCTGTACGATTAACAATTTCTGAAACTTACACTTTAGGCTTCAAGAAATTCCTTACCTTATTTGGGTACAGGCAAGATTAATAATAGCCAAATCGCAGAAATGGCAGAGCCAA
torA/S.P. : CACCCAAAAGCTACAGATGAGAAATTCATCCAAAGTTACAGCTTGAAGAGTTTGCCCTTACCTTACCTGATGGGCACT---AAAGATGCTATCCGCAAAACCCCTGATGGGCGGCTTA
torA/S.m. : CAGCAAAAAGCTACAGATGAGAAATTTATCCAAAGCTTACAGCTTGAAGAGTTTGCCCTTACCTTACCTGATGGGCACT---AAAGATGCTATCCGCAAAACCCCTGATGGGCGGCTTA
torA/S.c : CAGCAAAAAGCTACAGATGAGAAATTTATCCAAAGCTTACAGCTTGAAGAGTTTGCCCTTACCTTACCTGATGGGCACT---AAAGATGCTATCCGCAAAACCCCTGATGGGCGGCTTA
torA/S.t. : -----ATGAACAGATGCTGTGCGCGCAG

800
torA/P.P. : 880
torA/S.P. : 900
torA/S.m. : 920
torA/S.c : 940
torA/S.t. : 960
torA/P.P. : 980
torA/S.P. : 1000
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

820
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

840
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

860
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

880
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

900
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

920
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

940
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

960
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

980
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1000
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1020
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1040
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1060
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1080
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1100
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1120
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1140
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1160
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1180
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1200
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1220
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1240
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1260
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1280
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1300
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1320
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1340
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1360
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1380
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1400
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1420
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1440
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1460
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1480
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

1500
torA/P.P. :
torA/S.P. :
torA/S.m. :
torA/S.c :
torA/S.t. :

```

Figure 19 (suite 2)

toRA/p.p. :	1520	1540	1560	1580	1600	1620
toRA/S.p. :	TTGATTAATGACACCAACCTGCTGTTTCCGATATGTAATTAACCTGCTTGTACCCCAATTGAGCGTAAGATTAGTCAATATGTACTTATCAACGCGTATTTTGAACGTCAT					
toRA/S.m. :	TCGATGTAACCTGACACGACCTGTCGTTTCCGACATGCTGTGCGACGCTGACACCTATGAGCGTAATGCAATATGCAATGCTGTACGTAATGCGGATTTTCGGCATGCA					
toRA/S.c :	TTGATGTAACCTGACACGCAACTTGCCCTTCCGATATGCAATGCGCGCTGTGTACTATGAGCGCAACGATATGCAACGTTTACGCGCGCTATGCTTAAACCGGCTATTTTACCATGCA					
toRA/S.t. :	-----					
toRA/p.p. :	1640	1660	1680	1700	1720	1740
toRA/S.p. :	AAGCTAATGATCCGCTTATCAATAAAACAGACTTTCAGATATTTACTGAATTAACCGAACGCTTTGGAA					
toRA/S.m. :	AAAATGCTGACGCTTTGTTGAAAGCTTGCTGACTTGAGATCTTTACTGCTTGGCGCTGCTGGGTAAAGAAAGAAATACACCCGCAATATGAGCAATGAGTGGATAGAAACCT					
toRA/S.c :	AAAATGCTGACGCTTTGTTGAAAGCTTGCTGACTTGAGATCTTTACTGCTTGGCGCTGCTGGGTAAAGAAAGAAATACACCCGCAATATGAGCAATGAGTGGATAGAAACCT					
toRA/S.t. :	-----					
toRA/p.p. :	1760	1780	1800	1820	1840	1860
toRA/S.p. :	CTATTAACGAGTGTAAAGCCGCTAACCGCGTAAAGTATGATGCGCTGCACTTGGCACTTCTGAGCAAGGTTATGTACATTTTGGTAGAGCGCAATTTGACCGCCACGCTGACTTTAGAA					
toRA/S.m. :	CTATTAACGAGTGTAAAGCCGCTAACCGCGTAAAGTATGATGCGCTGCACTTGGCACTTCTGAGCAAGGTTATGTACATTTTGGTAGAGCGCAATTTGACCGCCACGCTGACTTTAGAA					
toRA/S.c :	CTATTAACGAGTGTAAAGCCGCTAACCGCGTAAAGTATGATGCGCTGCACTTGGCACTTCTGAGCAAGGTTATGTACATTTTGGTAGAGCGCAATTTGACCGCCACGCTGACTTTAGAA					
toRA/S.t. :	-----					
toRA/p.p. :	1880	1900	1920	1940	1960	1980
toRA/S.p. :	ACGATCCGTAATCAACCCATTAGGCAACGCTTCCGCTTGAATTTGAATCTTCACTGCTGAATTAACAATTTGGCTATGATGATGCGCAAGGCATCTATGTGATAAAAACTGAACGC					2000
toRA/S.m. :	ACGATCCGTAATCAATCCACTAGGCAACGCTTCCGCTTGAATTTGAATCTTCACTGCTGAATTAACAATTTGGCTATGATGATGCGCAAGGCATCTATGTGATAAAAACTGAACGC					
toRA/S.c :	ACGATCCGTAATCAATCCACTAGGCAACGCTTCCGCTTGAATTTGAATCTTCACTGCTGAATTAACAATTTGGCTATGATGATGCGCAAGGCATCTATGTGATAAAAACTGAACGC					
toRA/S.t. :	-----					
toRA/p.p. :	2020	2040	2060	2080	2100	2120
toRA/S.p. :	AGCCATGCTGCTCAGGTTGCAATTAATCTATGTTGCAATCTTCCATCCGATCCAGCTTACCTACACAAATGTGTGAGTCAAGAAATACCGGAAACCTTACACAGTTAATGTGTCG					
toRA/S.m. :	AGCCATGCTGCTCAGGTTGCTGCAATTAATCTATGTTGCAATCTTCCATCCGATCCAGCTTACCTACACAAATGTGTGAGTCAAGAAATACCGGAAACCTTACACAGTTAATGTGTCG					
toRA/S.c :	AGCCATGCTGCTCAGGTTGCTGCAATTAATCTATGTTGCAATCTTCCATCCGATCCAGCTTACCTACACAAATGTGTGAGTCAAGAAATACCGGAAACCTTACACAGTTAATGTGTCG					
toRA/S.t. :	-----					
toRA/p.p. :	2140	2160	2180	2200	2220	2240
toRA/S.p. :	CGAAGCTGTGTATTAATGACCTTCAAGATGCTAAAGCCGCTTAAAGATGCGATATGCTGCGGCTCTTAAAGACCGAGTCAACTGTTAAGCTGCGGAGTGTATCGAATCGTTCCCTA					
toRA/S.m. :	CGAAGCTGTGTATTAATGACCTTCAAGATGCTAAAGCCGCTTAAAGATGCGATATGCTGCGGCTCTTAAAGACCGAGTCAACTGTTAAGCTGCGGAGTGTATCGAATCGTTCCCTA					
toRA/S.c :	CGAAGCTGTGTATTAATGACCTTCAAGATGCTAAAGCCGCTTAAAGATGCGATATGCTGCGGCTCTTAAAGACCGAGTCAACTGTTAAGCTGCGGAGTGTATCGAATCGTTCCCTA					
toRA/S.t. :	-----					

Figure 19 (suite 3)

```

torA/p.p. : ----- 2260 . 2280 . 2300 . 2320 . 2340 . 2360 .
torA/s.p. : AAGGTAGTGC GAATTCA TGAAGTGC ATGGTAT GGGCCAG TGGGTAA GATGCG AGCTTGA AGGGGAG CGGAAAT CGGCTGT GCACTAT GTGACCTA ATACCTTA ACCTTAGAC
torA/s.m. : AAGGATTTGTCGGAATTCACGAAGGCCGCGTGGTATGGGCCAGTAAAGATGGTAGCACTGAAGTGGTGGCTGTAAGTGGCGCCCTGTGTGTATATGGCGATCCTAACACCCCTCACTTAGAC
torA/s.c : CTGGTATTGTGCGGATTCACGAAGCGCATGGTATGGGCCAGTAAAGATGCTAGCACTGAAGTGGCGCTGAAGTCCGCGCCCTGTGCA GTTATGGCGATCCTAACACCCCTCACTTAGAC
torA/s.t. : -----

torA/p.p. : ----- 2380 . 2400 . 2420 . 2440 . 2460 . 2480 .
torA/s.p. : ATTGTAACCTCTAAGTTGGCTCAAAGCTTGGCTCAGCCTATACATGTCTGTTGAGTTGAAAAATACCAAGGTAAAGCACTAAGGTTAGCTCCTTCGATGGTCCCTATCGAAGTTGAAATC
torA/s.m. : ATAGGCAACCTCTAAACTTGGCCCAAGCTTGGCTCAGCCTATATCTTGTAGTCGAGTTGAAAAATCCAAAGCCAAAGTGCCTTAAGGTCACCTCCTTCGATGGCCCGATCGAAGTCGAAATC
torA/s.c : ATAGGCACATCTAAACTTGGCCCAAGCTTGGCTCAGCCTATATCTTGTAGTCGAGTTGAAAAATCCAAAGCCAAAGTGCCTTAAGGTCACCTCCTTCGATGGCCCGATCGAAGTCGAAATC
torA/s.t. : -----
```

